# WIRKUNG FREIER FETTSÄUREN IN VITRO AUF EINIGE MILCHWIRTSCHAFTLICH RELEVANTE BAKTERIEN

ÖZER ERGÜN

Diss
München
1994

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

---

# WIRKUNG FREIER FETTSÄUREN IN VITRO AUF EINIGE MILCHWIRTSCHAFTLICH RELEVANTE BAKTERIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Özer Ergün
aus
Istanbul

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Tag der Promotion: 27. Juli 1984

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 2. | Schrifttum | 2 |
| 2.1 | Freie Fettsäuren in Milch und Milchprodukten | 2 |
| 2.1.1 | Allgemeines | 2 |
| 2.1.2 | Faktoren, die das Fettsäurespektrum beeinflussen | 5 |
| 2.1.2.1 | Mastitiden und Sekretionsstörungen | 8 |
| 2.1.2.2 | Technologische Faktoren | 10 |
| 2.2 | Der Einfluß von FFA auf die Qualität von Milch und Milchprodukten | 11 |
| 2.3 | Einfluß von FFA auf das Wachstum von Mikroorganismen | 14 |
| 2.3.1 | Wirkungsweise der FFA gegenüber Mikroorganismen | 17 |
| 3. | Eigene Untersuchungen | 24 |
| 3.1 | Material | 24 |
| 3.1.1 | Bakterien | 24 |
| 3.1.2 | Freie Fettsäuren (FFA) | 24 |
| 3.2 | Methodik | 25 |
| 3.2.1 | Untersuchungen zur Wirkung freier Fettsäuren auf Bakterien in flüssigen Kulturmedien | 26 |
| 3.2.1.1 | Messung der Wirkung über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten bzw. den Wachstumsindex | 26 |
| 3.2.1.2 | Messung der Wirkung mit einem optischen Verfahren | 28 |
| 3.2.1.3 | Wirkung von freien Fettsäuren auf hitzegestreßten B. cereus | 29 |
| 3.2.1.4 | Wirkung von freien Fettsäuren auf C.tyrobutyricum | 30 |
| 3.2.2 | Untersuchungen zur Wirkung freier Fettsäuren auf Bakterien in festen Kulturmedien | 30 |

Seite


| | | |
|---|---|---|
| 3.2.2.1 | Messung der Wirkung über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten | 30 |
| 3.2.2.2 | Messung der Wirkung mit der ökometrischen Technik | 31 |
| 3.3 | Ergebnisse | 33 |
| 3.3.1 | Untersuchungen zur Wirkung freier Fettsäuren auf Bakterien in flüssigen Kulturmedien | 33 |
| 3.3.1.1 | Messung der Wirkung über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten bzw. den Wachstumsindex | 33 |
| 3.3.1.2 | Messung mit einem optischen Verfahren | 36 |
| 3.3.1.3 | Wirkung von freien Fettsäuren auf hitzegestreßten B.cereus | 55 |
| 3.3.1.4 | Wirkung von freien Fettsäuren auf C.tyrobutyricum | 55 |
| 3.3.2 | Untersuchungen zur Wirkung freier Fettsäuren auf Bakterien in festen Kulturmedien | 56 |
| 3.3.2.1 | Messung der Wirkung über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten | 56 |
| 3.3.2.2 | Messung der Wirkung mit der ökometrischen Technik | 58 |
| 4. | Besprechung der Ergebnisse und Diskussion | 60 |
| 5. | Zusammenfassung | 68 |
| | Summary | 70 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 72 |

## 1. Einleitung

In den letzten Jahren werden bei der Herstellung von Milchprodukten insbesondere bei der Reifung von Käse Enzyme eingesetzt. Die durch Lipasezusatz angestrebte Aromabildung ist primär auf die Freisetzung von Fettsäuren (FFA) aus dem Milchfett zurückzuführen. Im Zusammenhang damit ergab sich die Frage, ob vermehrt vorhandene FFA Einfluß auf Mikroorganismen haben, und zwar sowohl auf nützliche wie die Starterkulturen als auch auf schädliche wie Verderbniserreger und pathogene Keime.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von in Käse natürlicherweise vorkommenden FFA auf die erwähnten Mikroorganismen in vitro getestet werden. Gleichzeitig sollten verschiedene Untersuchungsmethoden, mit denen der Einfluß von FFA auf die Vermehrung von Mikroorganismen geprüft werden kann, hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit verglichen sowie auf Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit beurteilt werden.

## 2. Schrifttum

### 2.1 Freie Fettsäuren in Milch und Milchprodukten

Für die Aromabildung in Milch und Milchprodukten spielen unter Fettabbauprodukten wie Peroxiden, Aldehyden, Methylketonen, Lactonen und ähnlichen Substanzen die freien Fettsäuren eine dominierende Rolle (RENNER, 1982).

#### 2.1.1 Allgemeines

Das Milchfett besteht zu 98 bis 99 % aus Triglyceriden und zu 0,2 bis 1 % aus Phosphorlipiden (GRAVERT, 1983).

In Milchfett wurden bisher etwa 140 verschiedene freie Fettsäuren nachgewiesen, von denen jedoch nur ein relativ geringer Anteil mehr als 1 % ausmacht. Bei den niedermolekularen Fettsäuren überwiegt die Buttersäure mit 3,2 %, während bei den mittelkettigen vor allem die Caprin-, Laurin- und Myristinsäure in größerer Konzentration (2,9 %, 4,8 bzw. 11,8 %) vorliegen. Insgesamt dominieren jedoch die langkettigen Fettsäuren Palmitinsäure 27,4 % und Stearinsäure 10,4 %). Den Hauptanteil bei den ungesättigten freien Fettsäuren bildet die Ölsäure mit 22,9 %, während der Anteil der Linol- und Linolensäure mit 3,6 % bzw. 1,1 % verhältnismäßig niedrig ist (DROESE et al. 1976).

Die Lipolyse von Milchfett durch Milchlipase oder durch bakterielle Lipasen gilt als wichtigster Faktor für die Entstehung freier Fettsäuren. Darüber hinaus können diese zu weiteren, sekundären Komponenten umgesetzt werden.

Der erste Schritt des Abbaus ist die hydrolytische Spaltung der Esterbindung des Triglycerids in Gegenwart von Wasser und einer spezifischen Esterase und Lipase. Es entsteht zunächst ein Diglycerid und eine freie Fettsäure, danach werden auch die zweite und dritte Fettsäure hydrolysiert (FOISSY, 1969).

Bei der Hydrolyse der freien Fettsäuren können aber auch nichtenzymatische Vorgänge von Bedeutung sein (GOULDEN 1970; NAWAR, 1969). Während die Fettsäurezusammensetzung des Milchfettes durch lipolytische Vorgänge nur wenig verändert wird, treten während der Käsereifung durch Lipolyse, aktiviert durch mikrobielle und Milchlipasen, mehr oder weniger ausgeprägte Veränderungen im Spektrum der freien Fettsäuren auf.

Zur Ermittlung des Fettsäurespektrums werden in erster Linie die Gaschromatographie, GC (PATTON et al. 1960; DEMAN 1961; KHATRI und DAY 1962; NIEUWENHOF 1970; DULLY und GRIEVE 1974; HORWOOD und LLOYD 1980), die Gasflüssigchromatographie, GLC (EFTHYMIOU 1957; HANKINSON et al. 1958; SMITH 1961; GANDER et al. 1962; BILLS et al. 1963; KINTNER und DAY 1965) und die Hochdruckflüssigkeitschromatographie, HPLC (DURST et al. 1975; JORDI 1978; TWEETEN und WETZEL 1979) eingesetzt.

Will man Zusammenhänge zwischen in Milch und Milchprodukten vorkommenden FFA und spezifischen Mikroorganismen und dabei möglicherweise auftretende Interferenzen untersuchen oder beurteilen, ist es erforderlich, auf die Löslichkeitsverhältnisse der FFA in Nährmedien und die Temperatureinflüsse, denen diese unterliegen, näher einzugehen.

Die Löslichkeit der gesättigten Fettsäuren steigt mit der Zunahme des hydrophoben Charakters des Lösungsmittels und der Temperatur an. Außerdem nimmt mit steigender Kettenlänge der FFA in hydrophoben Lösungsmitteln die Löslichkeit zu, während sie in hydrophileren Lösungsmitteln abnimmt.

Aufgrund dieses unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens der verschiedenen FFA wandten die einzelnen Autoren entsprechend unterschiedliche Methoden an, um die FFA im Nährmedium zu lösen bzw. homogen zu verteilen. Als besonders günstig erwies sich dabei eine ethanolische Fettsäurelösung (COSTILOW und SPECK, 1951; SHEU und FREESE, 1972; GALBRAITH et al., 1971; GALBRAITH und MILLER, 1973a; MACASKIE, 1982).

Aber auch andere Lösungsmittel, z.B. Dimethylsulfoxid (SHEU und FREESE, 1973) und Lösungsmittelgemische, wie n-Hexan/Ethanol (1 : 1) (v/v) (HECZKO et al., 1979) wurden mit Erfolg eingesetzt. Um eine homogene Verteilung der FFA im Nährmedium zu erzielen, arbeitete MAXCY (1964) mit Tween 40 als Lösungsvermittler.

Unterschiedlich erfolgte auch die Zugabe der FFA-Lösung zum Nährmedium. Während SHEU und FREESE (1972) die FFA-Lösung durch ein Membranfilter sterilfiltrierten und dann zum autoklavierten Medium gaben, autoklavierten COSTILOW und SPECK (1951) die homogenisierte Mischung aus FFA-Lösung und Nährmedium. MACASKIE (1982) dagegen erwärmte die ethanolische FFA-Lösung (Palmitinsäure) auf 42°C und gab sie dann zum sterilen Nährmedium, während HECZKO et al. (1979) das autoklavierte Medium auf 48°C kühlten und anschließend mit den FFA homogen vermischten. Aber auch der Zusatz der FFA zum autoklavierten Medium - ohne die vorher beschriebenen Maßnahmen - wird in der Literatur (KHAN und KATAMAY, 1968) beschrieben.

Aus den vorangegangenen Darstellungen kann abgeleitet werden, daß ein Autoklavieren der FFA nicht unbedingt erforderlich ist. Die Möglichkeit, daß durch die Luft- und Hitzeeinwirkung beim Autoklavieren (1/2 Std., 1,2 atü) autoxidative Vorgänge ablaufen, spricht sogar gegen dieses methodische Vorgehen.

Nach TÄUFEL (1958) läßt sich die Autoxidation folgendermaßen formulieren:

1. Aus der durch die benachbarte Doppelbindung aktivierten Methylengruppe wird unter Energiezufuhr ein H-Atom abgespalten,
2. in der Induktionsperiode (oder einleitenden Phase) nimmt dann das gebildete Radikal Sauerstoff auf und wird zum Peroxidradikal,

3. das Peroxidradikal entzieht der aktivierten Methylengruppe eines weiteren Fettsäuremoleküls ein H-Atom und geht dabei in ein Hydroperoxid über,
4. das verbleibende Radikal addiert wiederum Sauerstoff, setzt als Peroxidradikal die Reaktionskette fort und führt damit zur Kettenreaktion.

Autokatalyse führt zu der für eine Kettenreaktion typischen Steigerung des Reaktionsablaufes, der exogen durch Luft und Wärme, endogen z.B. durch Metalle (Cu, Fe, Mn, Co, Ni) katalysiert wird. Die primären Peroxide erfahren wietere tiefgreifende Umwandlungen. Beim Molekülabbau entstehen Aldehyde und Ketone verschiedenster Art, Mono- und Dicarbonsäuren, Keto-Aldehyd-Hydroxy- oder Epoxisäuren (GADDIS und Mitarbeiter, 1959). Die wichtigsten Primärprodukte der Fettsäureoxidation sind die Peroxide, die in Form von Hydroperoxiden, cyclischen Peroxiden und Epi-Peroxiden auftreten können. Da der in diesen Verbindungen anwesende "aktive" Sauerstoff sehr reaktionsfähig ist, ist der Nachweis dieser Verbindungen relativ leicht zu führen. Dies bezieht sich jedoch nicht auf die bei stärker fortgeschrittener Oxidation gebildeten Aldehyd-, Keto- und Dialkylperoxide. Bei der analytischen Bestimmung von Peroxiden und der Auswertung der erhaltenen Ergebnisse darf auch nicht übersehen werden, daß Peroxide kein bleibender Bestandteil autoxidierter FFA sind, sondern bei erhöhter Temperatur relativ leicht in nicht peroxidische Verbindungen übergehen können (PARDUN, 1969).

### 2.1.2 Faktoren, die das Fettsäurespektrum beeinflussen

Für die FFA-Zusammensetzung in der Milch spielen neben tierindividuellen Unterschieden noch andere Faktoren eine bedeutende Rolle, auf die im folgenden kurz eingegangen werden soll.

SHANIN (1977) und RENNER (1982) berichten, daß eine Fütterungsumstellung von Maissilage auf Zuckerrübenblätter bzw. auf Weidefütterung zu einem signifikanten Anstieg im Gehalt an freien Fettsäuren in der Milch führen. Die Erhöhung liegt dabei in einer Größenordnung, die sich sensorisch bemerkbar machen kann, so daß daraus abgeleitet werden kann, daß fütterungsbedingte Veränderungen im Geruch und Geschmack der Milch auch mit Veränderungen in der Konzentration an freien Fettsäuren zusammenhängen können (Tab. 1).

Tabelle 1: Einfluß von Fütterungsumstellungen auf den Gehalt an freien Fettsäuren in der Milch (RENNER, 1982)

| Versuch | vor bzw. nach der Umstellung | Gehalt an freien Fettsäuren in % |
|---|---|---|
| I | vor | 0,11 |
| | nach | 0,19 |
| II | vor | 0,12 |
| | nach | 0,17 |

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch KUZDZAL (1962), der beobachtete, daß eine Fütterungsumstellung von Stallfütterung mit Winterfutter auf Weidefütterung eine Erhöhung des Fettsäuregehaltes verursacht.

Die jahreszeitlich bedingten Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung lassen auch die Ergebnisse von TIMMEN (1977) erkennen. Im Vergleich zum Sommerfett stellte er im Winterfett einen erhöhten Gehalt an niedermolekularen Fettsäuren und einen erheblich erhöhten Gehalt an Laurin-, My-

ristin- und Palmitinsäuren fest, während die Öl-, Linol- und Linolensäurewerte erheblich unter denen des Sommerfettes lagen. Unter den verschiedenen Faktoren, die für die Fettsäurezusammensetzung in der Milch eine Rolle spielen, soll auch die Laktationsperiode nicht unerwähnt bleiben.

RENNER (1982) konnte bei seinen Untersuchungen im Gesamtgehalt an freien Fettsäuren zwischen der Kolostralmilch und der reifen Milch keinen Unterschied feststellen, wohingegen gegen Ende der Laktationsperiode der Fettsäuregehalt erheblich anstieg (Tab. 2).

Tabelle 2: Gesamtgehalt an freien Fettsäuren während der Laktationsperiode

| Laktationsabschnitt | Gehalt an freien Fettsäuren in % |
|---|---|
| 1. Woche | 0,15 |
| 1. - 7. Monat | 0,15 |
| 8. - 10. Monat | 0,19 |

Auch im Anteil an kurzkettigen Fettsäuren besteht zwischen Kolostralmilch und reifer Milch kein wesentlicher Unterschied, in der späten Laktationsperiode ist ihr Anteil sogar rückläufig (Tab. 3).

Tabelle 3: Kurzkettige freie Fettsäuren ($C_6$ - $C_{12}$) in der Milch während der Laktationsperiode

| Laktations-abschnitt | kurzkettige freie Fettsäuren in % | in mg/kg Fett |
|---|---|---|
| 1. Woche | 8,1 | 102 |
| 2. - 7. Monat | 8,2 | 104 |
| 8. - 10. Monat | 7,3 | 111 |

Die Ergebnisse von SENFT und KLOBASA (1970) zeigen, daß die Anteile von flüchtigen freien Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von 14 C-Atomen in der Kolostralmilch, insbesondere im 1. Gemelk, sehr gering sind und bis zum 15. Laktationstag ansteigen, während der Anteil an Myristin- und Palmitinsäure nach dem Kalben sehr hoch war.

2.1.2.1 Mastitiden und Sekretionsstörungen

In Abhängigkeit von der Entzündungsstufe und dem Grad der Sekretionsstörung im Euter differieren die Werte der im Milchfett enthaltenen gesättigten und ungesättigten freien Fettsäuren. TARASSUK und YAGUCHI (1958), KISZA und BATURA (1969), TALLAMY und RANDOLPH (1969), RANDOLPH und ERWIN (1974) und JELLEMA (1975) untersuchten den Einfluß von Mastitiden auf die Fettsäurekonzentration in Viertelgemelksproben. Dabei stellten sie übereinstimmend bei mastitiserkrankten Tieren einen Anstieg der kurzkettigen ($C_4$ - $C_{12}$) und ungesättigten ($C_{18+1}$ und $C_{18+2}$) Fettsäuren fest, während die langkettigen Palmitin- und Stearinsäure in verminderter Konzentration vorlagen. Ergebnisse von RANDOLPH und ERWIN (1974) sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Ursache für diese Ergebnisse dürfte die veränderte Lipaseaktivität bei an Mastitis erkrankten Tieren sein.

Tabelle 4: FFA-Gehalt in normaler und Mastitismilch (RANDOLPH und ERWIN, 1974)

| FFA | normale Milch | Mastitismilch |
|---|---|---|
| | mg/g Fett | |
| 4 : 0 | 1,36 | 1,60 |
| 6 : 0 | 0,59 | 0,93 |
| 8 : 0 | 0,48 | 0,54 |
| 10 : 0 | 1,29 | 1,35 |
| 12 : 0 | 1,35 | 1,62 |
| 14 : 0 | 2,23 | 2,90 |
| 16 : 0 | 5,11 | 7,89 |
| 18 : 0 | 2,41 | 4,27 |
| 18 : 1 | 6,63 | 10,16 |
| 18 : 2 | 1,14 | 1,82 |
| Total | 23,17 | 34,10 |

Auch RENNER (1982) kann die durch Sekretionsstörung verursachte Konzentrationserhöhung einzelner freier Fettsäuren bestätigen. Er berichtet von einem Anstieg der kurzkettigen Fettsäuren ($C_6$ - $C_{12}$) um rund 60 % und der ungesättigten sogar um 150 %.

Tabelle 5: Einfluß einer Sekretionsstörung auf den Gehalt an freien Fettsäuren in der Milch (RENNER, 1982)

| Zellzahl pro ml | Gehalt an freien Fettsäuren in % |
|---|---|
| < 500 000 | 0,16 |
| 500 000 - 1 Mill. | 0,31 |
| > 1 Mill. | 0,33 |

Um eine Korrelation zwischen freiem Fettsäuregehalt und hohem Zellgehalt in der Milch zu untersuchen, wurde in getrennten Vierteln von Kühen durch intramammäre Infusion von Endotoxin oder Streptococcus agalactiae ein hoher Zellgehalt erzeugt (SALIH und ANDERSON, 1978). Bei beiden Behandlungsarten korrelierten die FFA-Veränderungen mit den Veränderungen im Zellgehalt.

2.1.2.2 Technologische Faktoren

Der Gehalt an FFA in der Rohmilch wird wesentlich durch mechanische Kräfte bestimmt, die auf das noch warme Substrat einwirken. Daher werden besondere Anforderungen an die technischen Anlagen gestellt.

Nach WORSTORFF (1975) steigt das Risiko einer mechanischen Schädigung der Fettkügelchen durch die verschiedenen Systeme des maschinellen Milchentzugs in folgender Reihenfolge an:

Eimermelkanlage,
Eimermelkanlage mit Transfersystem,
Melkstand mit tiefverlegter Melkleitung,
Melkstand mit Recorder,
Melkstände mit hochverlegten Milchleitungen.

Bei manuellem Melken enthält die Milch durchschnittlich 5,2 mg % FFA, während der Gehalt an FFA in mechanisch ermolkener Milch im Mittel bei 10 mg % liegt (ATRAMJENTOW et al., 1976). Die Tatsache, daß eine stärkere mechanische Behandlung und eine Temperatursteigerung die Gehalte von FFA in der Milch erhöhen, wurde auch von WORSTORFF et al. (1972), TOLLE und HEESCHEN (1975), JELLEMA und SCHIPPER (1975), AULE und WORSTORFF (1975) und BORSHEIM (1982) bei ihren Untersuchungen bestätigt.

Um die Beeinflussung der Lagerungstemperatur auf die Fettsäurezusammensetzung der Milch zu bestimmen, ließ RENNER (1982) die Milch unmittelbar nach dem Melken tiefkühlen und

bis zu zehn Tagen bei 4°C lagern. Schon nach eintägiger Kühlung beobachtete er einen signifikanten Anstieg der FFA, der sich im Verlauf der nächsten Tage weiter vergrößerte. Die Lagerung von H-Milch bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, 20°C und 38°C) und unterschiedlichem Homogenisierzeitpunkt führte dazu, daß der Gehalt an FFA in den im aseptischen Bereich homogenisierten H-Milch-Proben während der Lagerung von sechs Monaten nicht so stark anstieg wie in den im septischen Bereich (vor der Ultrahocherhitzung) homogenisierten Proben. Dies gilt sowohl für die Lagerung bei Zimmertemperatur als auch bei 38°C.

Auch bei Milchprodukten wie Käse (ZEGARSKA und BUDSLAWSKI, 1973; HANSPACH, 1981) und Butter (POJARKOWA et al., 1979; SHANIN, 1982) korrelierten die FFA-Gehalte mit der Lagerungszeit und -temperatur. Den Einfluß von Hitzebehandlungsverfahren auf den Gehalt an FFA untersuchten u.a. WITHYCOMBE und LINDSAY, 1969. Sie beobachteten eine Reduzierung der FFA mit steigender Temperatur der Milch.

## 2.2 Der Einfluß von FFA auf die Qualität von Milch und Milchprodukten

Der Gehalt freier Fettsäuren findet national und international als Qualitätsparameter von Milch und Milchprodukten zunehmendes Interesse. Die Anhäufung der bei der Lipolyse entstehenden Reaktionsprodukte führt zu einer Entwicklung von Geschmacksfehlern in Milch und Milchprodukten sowie zu Verlusten bei der Fettseparation in Zentrifugen (SUHREN, HEESCHEN und TOLLE, 1977).

Gleich nach dem Milchentzug beginnt in der Milch eine Vielzahl biochemischer Reaktionen, die Aromaveränderungen bis zum Verderb verursachen können. Chemische und physikalische Veränderungen in der Milch können bei der Herstellung hochwertiger Milchprodukte zu Problemen führen. Unter diesen Reaktionen kommt der Lipolyse eine besondere Bedeutung zu,

da die Kumulation der Reaktionsprodukte, besonders der FFA, für die Entwicklung von Aromafehlern wie ranzig, seifig, talgig u.a. verantwortlich ist. Dieser Effekt wird besonders bei fettreichen Milchprodukten wie Butter beobachtet (KINTNER und DAY, 1965; WITHYCOMBE und LINDSAY, 1969; HÄNNI, RYCHENER, 1980; SUHREN, 1981; RENNER, 1982).

Nach BRANDL (1970) sind die Folgen der durch lipolytische Mikroorganismen ausgelösten Freisetzung der einzelnen Fettkomponenten für Milch, Rahm und Butter vielfältiger Natur, im allgemeinen jedoch für die Qualität dieser Produkte äußerst nachteilig. Sie werden ranzig, d.h. sie hinterlassen bei der organoleptischen Prüfung auf der Zunge einen kratzigen und bitteren Geschmack. Verantwortlich hierfür sind in erster Linie die freien Fettsäuren, die z.B. der Milch bei Mengen ab 100 µM / 100 g Milch (Caprinsäure schon ab 6 µM) einen ranzigen Geschmack verleihen. Nach WILLART (1959) genügen in Butter hierfür Fettsäuremengen in der Größenordnung von 0,19 m Äquivalenten / 10 g Butter. Hatte man früher die Gegenwart freier Butter- und Capronsäure als verantwortlichen Faktor bei ranzigem Butterfett betrachtet (BRANDL, 1970), so sind nach AL-SHABIB et al. (1964) Caprin- und Laurinsäure die dafür charakteristischen Substanzen. Ein Zusatz von Linolensäure führte zu einem Beigeschmack, den sie mit "oxidiert" bezeichneten. Unmittelbar an der Geschmacksbeeinflussung sind also nur die bei der Milchfetthydrolyse freigesetzten kurz- und mittelkettigen FFA beteiligt. Aber auch die höheren freien Fettsäuren können sich auf die Qualität von Butter und Trockenmilch auswirken, dies indirekt, weil sie nach Freisetzung leichter oxidiert werden und damit einer Umwandlung zu spezifischen Geschmackssubstanzen unterliegen. Nach AULE und WORSTORFF (1975) ist Milch mit einem hohen Gehalt an FFA minderwertig, nicht nur, weil sie schlechtere Milchprodukte ergibt, sondern auch, weil sie größere Fettverluste bei der Separation bewirkt.

Während die Wirkung mikrobieller Lipasen in Milch und But-

ter in jedem Fall unerwünscht ist, ist eine mehr oder weniger ausgeprägte mikrobielle Fettspaltung in vielen Käsesorten notwendig. Ihre Bedeutung liegt darin, daß Abbauprodukte des Milchfettes Bestandteile des Käsegeschmackes darstellen. Es ist jedoch wichtig, daß die Menge der FFA, die bei der Käsereifung entsteht, ein gewisses Maß nicht überschreitet, da ansonsten auch beim grundsätzlich erwünschten Vorgang ranziger Geschmack auftreten kann (HOOD et al., 1950).

Die meisten Käsesorten - mit Ausnahme von Frischkäse - durchlaufen einen mehr oder weniger langen Reifungsprozeß, der fast ausschließlich enzymatisch bzw. biologisch-biochemisch bedingt ist. Die Substrate, an denen die wichtigsten biochemischen Veränderungen während der Käsereifung ablaufen, sind in erster Linie Milchfett, Casein und Laktose, wobei sich viele unterschiedliche Abbauprodukte akkumulieren, die teilweise weiteren Veränderungen unterliegen und das typische Käsearoma bestimmen (OBRETENOW et al., 1978).

Am Käsearoma sind nach BEHNKE (1980) zahlreiche Stoffklassen beteiligt, wie freie Fettsäuren, schwefelhaltige Verbindungen, Alkohole, Carbonylverbindungen, Ester, Laktone, Aminosäuren, Peptide, Amine u.a. Das Milchfett ist für die meisten Käsesorten ein bedeutender Bestandteil, da es als Lieferant der FFA zur Ausbildung des Aromas beiträgt. OHREN et al. (1969) folgerten aus ihren Untersuchungen, daß das Verhältnis von Acetat zu FFA in Cheddar innerhalb bestimmter Grenzen liegen muß, wenn ein wünschenswertes Aroma vorliegen soll, was REITER et al. (1971) nicht bestätigen konnten. LIEBICH u.a. (1970) vertraten die Ansicht, daß die freien Fettsäuren die Grundlage eines jeden Käsearomas sind und daß das jeweilige charakteristische Aroma dem Verhältnis von FFA und der Zusammensetzung einer Mischung anderer flüchtiger Komponenten entspricht. Nach den Ergebnissen von GRAY u.a. (1972) spielen dagegen freie $C_2$- $C_{10}$-Fettsäuren

keine entscheidende Rolle für das typische Aroma von reifem Cheddar, während MANNIG et al. (1973) erwähnen, daß die FFA für die Erzeugung des Käsearomas nicht notwendig sind, daß sie aber, vor allem die Buttersäure, zum Gesamtaroma beitragen können.

Diese zum Teil sich widersprechenden Angaben über die Bedeutung der FFA als Aromakomponenten zeigen deutlich, wie unsicher und schwierig die Einordnung einzelner Verbindungen für das Gesamtaroma ist.

## 2.3 Einfluß von FFA auf das Wachstum von Mikroorganismen

FFA sind in der Lage, das Wachstum von Mikroorganismen zu beeinflussen; so sind fungistatische und bakteriostatische Wirkungen seit langem bekannt (KIESEL, 1913; HOFFMANN et al.,1939; RIGLER und CREATHOUSSE, 1940; COWLES,1941; CHRISTOW, 1971).

In der Tuberkuloseforschung wurde den ungesättigten Fettsäuren ein antituberkulöser Effekt zugeschrieben (HEILMAYER, 1949). Nach NIEMANN (1954) spielen für die Wirkung von FFA auf das Wachstum von Mikroorganismen folgende Parameter eine Rolle: Art der Mikroorganismen, Struktur und Konzentration der FFA, Gegenwart von Inhibitoren, die eine eventuell vorhandene Wachstumshemmwirkung aufheben, Gegenwart antitoxisch wirksamer Agentien sowie Dauer der Inkubation.

KODICEK und WORDEN (1945) stellten wachstumshemmende Wirkung von Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure gegenüber grampositiven Bakterien fest, während eine Wirkung gegenüber gramnegativen Keimen nicht zu verzeichnen war.

Bei der Untersuchung des wachstumshemmenden Effektes von 30 geradzahligen Fettsäuren und deren Derivate fanden KABARA et al. (1972) unter den gesättigten Fettsäuren für Laurinsäure die stärkste Hemmwirkung gegenüber grampositiven Keimen.

NILSSON und WILLART (1966) beobachteten, daß Capryl-, Caprin- und Laurinsäure in Konzentrationen von 2,5 mmol und mehr die Vermehrung von Starterkulturen beeinflussen, während Myristin- und Ölsäure eine geringere, Butter- und Palmitinsäure keine Wirkung zeigten. In Konzentrationen von 1 mmol zeigten nur Caprin- und Laurinsäure Wirkung.

In FFA-reicher Milch wurden thermophile Milchsäurebakterien, insbesondere Streptokokken, gehemmt (SCHWAB, 1969). COSTILOW und SPECK (1951) fanden heraus, daß das Wachstum von Sc. lactis in Milch von Capryl-, Caprin- und Laurinsäure gehemmt wurde. ANDERS und JAGO (1964) zeigten, daß das Wachstum von verschiedenen Stämmen von Sc. cremoris, Sc. lactis und Sc. lactis subsp. diacetylactis in Gegenwart von FFA dem ähnelte, was COSTILOW und SPECK (1951) herausgefunden hatten, mit der Ausnahme, daß Sc. cremoris unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Ölsäure zeigte. Andererseits waren Stämme von Sc. lactis und Sc. lactis subsp. diacetylactis gegenüber Ölsäure völlig unempfindlich.

MAXCY und CHANDAN (1962) berichten, daß FFA in Milch die Vermehrung von Sc. lactis hemmen, während die kurzkettige FFA, z.B. Buttersäure, auf das Wachstum von Sc. lactis in Milch keinen Einfluß zeigten (MAXCY, 1964).

KULSHRESTHA und MARTH (1974c) haben festgestellt, daß Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure in Konzentrationen von 1000 ppm die Vermehrung von Sc. lactis hemmen und auch bei Konzentrationen von 10 und 100 ppm fast immer inhibitorisch waren. Mischungen dieser FFA zeigten eine noch stärkere Hemmwirkung. PODESTA und BERTOLDINI (1967) beobachteten eine Hemmwirkung auf Sc. lactis und Sc. agalactiae, wenn sie mit gesättigten FFA ($C_4$ - $C_{18}$) und mit den ungesättigten Öl-, Linol- und Linolensäuren arbeiteten. Dabei zeigten die niederkettigen FFA ($C_6$-$C_{12}$) die größte Hemmwirkung.

HECZKO et al. (1979) testeten 117 Stämme Streptokokken der Gruppen A, B, C und G gegenüber Caprin-, Laurin-, Linol-

und Linolensäure, wobei die Laurinsäure die stärkste Hemmung bewirkte.

Die hemmende Wirkung von FFA auf das Wachstum bestimmter Lactobacillen wurde u.a. von GYLLENBERG (1954), PODESTA und BERTOLDINI (1967), BUCKER et al. (1979) untersucht. KODICEK und WORDEN (1944) beschrieben den hemmenden Einfluß von Linol- und Linolensäure auf das Wachstum von Lactobacillus helveticus. Gegen den gleichen Stamm testeten POZANSKI et al.(1968) Ölsäure und stellten dabei keine Wirkung fest.

TOMARELLI et al.(1950) fanden, daß Laurinsäure von allen getesteten gesättigten Fettsäuren auf die Vermehrung von Lactobacillus bifidus die stärkste Hemmwirkung ausübte.

HASSININ et al. (1951) stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß das Wachstum von L.bifidus, L.arabinosus und L. leichmanii durch die FFA der Kettenlänge $C_8$-$C_{10}$ und $C_{12}$ gehemmt wurden und L.lactis und L.casei gegenüber $C_8$- und $C_{14}$-Fettsäuren empfindlich waren. SPECTOR (1946) berichtete,daß die FFA von einer Butter-Kornöl-Mischung in höheren Konzentrationen auf das Wachstum von E.coli eine Hemmung ausüben, während bei kleinen Konzentrationen kein Einfluß festgestellt wurde.

KULSHRESTHA und MARTH (1974a) fanden, daß Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure in höheren Konzentrationen die Vermehrung von E.coli kurzzeitig hemmten,während die langkettigen FFA die Vermehrung auch vorübergehend nicht verhinderten (PODESTA und BERTOLDINI, 1967).

Untersuchungen von KHAN und KATAMAY (1968) ergaben, daß die FFA mit neun und mehr C-Atomen die Vermehrung von Salmonellen beeinflussen. Auch KULSHRESTHA und MARTH (1975a) berichteten, daß Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure und Mischungen davon das Wachstum von Salmonella typhimurium hemmen.

KODICEK und WORDEN (1944) stellten bei ihren Untersuchungen erhöhtes Wachstum von S. aureus durch die Einwirkung von Linol- und Linolensäure fest. Ebenfalls bei diesem Keim beobachteten VADEHRA und HARMON (1965) keinen Einfluß von Ölsäure auf das Wachstum, während nach PODESTA und BERTOLDINI (1967) Capron-, Capryl-, Caprin und Laurinsäure Hemmung bewirkte. Der Einfluß von FFA auf andere Mikroorganismen wie Cl. botulinum (FOSTER und WYNE, 1948), Aerobacter und Proteus (HASSINEN et al., 1951), Pseudomonas fragi (SMITH und ALFORD, 1966), Pasteurella pestis (EISLER und METZ, 1968), Penicillium roqueforti (EITENMILLER et al., 1970) und Bacillus subtilis (SCHEU und FREESE, 1973) wurde beobachtet.

Es wurde auch berichtet, daß FFA auf Viren einen Einfluß zeigten (STOCK und FRANCIS, 1943; KOHN et al., 1980).

### 2.3.1 Wirkungsweise der FFA gegenüber Mikroorganismen

Nach Untersuchungen von GALBRAITH et al. (1971) liegt der antibakteriellen Wirksamkeit der Fettsäuren ein charakteristisches Muster zugrunde. Von den im Fett vorhandenen ist bis zu einer Kettenlänge von $C_6$ keine Hemmwirkung auf Bakterienwachstum festzustellen. Fettsäuren mit längeren Ketten zeigten Hemmwirkung in der Reihenfolge:

$$C_8 < C_{10} < C_{12} \geq C_{14} > C_{16} \geq C_{18}.$$

Die antibakterielle Aktivität der $C_{18}$-Fettsäuren bezogen auf Sättigung und isomere Form verhielt sich wie folgt:

$$C_{18:0} < C_{18:0\ (trans)} < C_{18:1\ (cis)} < C_{18:2} \leq C_{18:3}$$

Um antibakteriell wirksam sein zu können, müssen Fettsäuren einerseits in Lösung sein und andererseits genügend lipophile Eigenschaften besitzen, um an der Zelloberfläche adsorbiert zu werden (GALBRAITH et al., 1971; KABARA et al., 1972).

Bei den gesättigten Fettsäuren weist die Laurinsäure optimal die beiden einander entgegengesetzten Eigenschaften der Wasserlöslichkeit einerseits und lipophilen Aktivität andererseits auf. Mit steigender Kettenlänge wird die abnehmende Wasserlöslichkeit der Fettsäuren zum limitierenden Faktor für die antibakterielle Aktivität. Die ungesättigten $C_{18}$-Fettsäuren (mit Ausnahme der Elaidinsäure) unterscheiden sich von den gesättigten langkettigen Fettsäuren, die als hydratisierte Teilchen vorliegen, insofern, als sie sich wie Flüssigkeiten in Lösung verhalten und so erhöhte Löslichkeit und lipophile Aktivität miteinander verbinden (GALBRAITH et al., 1971).

Nach NETTER (1969) beanspruchen Fettsäuremoleküle mehr Platz durch Doppelbindungen und darüber hinaus mehr Raum durch die cis- als die trans-Form. Je größer die Fläche ist, die von einem einzelnen Molekül besetzt wird, desto weniger Moleküle werden benötigt, um empfindliche Stellen auf der Bakterienoberfläche zu besetzen. Darüber hinaus können Doppelbindungen bei ungesättigten Fettsäuren in stärkerem Maße sterische Effekte hervorrufen als die Moleküle der gesättigten Fettsäuren. Nach dieser Theorie müßte Elaidinsäure aufgrund ihres erhöhten räumlichen Bedarfs aktiver sein als Stearinsäure. Ölsäure wäre wegen der stärkeren Löslichkeit und wegen ihres expandierenden Charakters aktiver als Elaidinsäure, während Linol- und Linolensäure aufgrund der Doppelbindungen noch aktiver wären.

FROBISHER (1926) und HOTCHKISS (1946) führten die antibakterielle Aktivität langkettiger Fettsäuren auf oberflächenaktive Effekte zurück. Allerdings ist nach GALBRAITH et al. (1971) die Oberflächenaktivität per se nicht für die antibakterielle Wirksamkeit verantwortlich zu machen. Letztgenannte Autoren verglichen Laurinsäure und Na-lauryl-sulfat. Bei ähnlich molaren Konzentrationen zeigen beide den gleichen bakteriziden Effekt, aber unterschiedliche Oberflächenaktivität. Wurde in diesem Zusammenhang der pH-Wert gesenkt,

so war Na-lauryl-sulfat weniger aktiv als Laurinsäure. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß durch Abnahme der Ionisation der Öl/Wasser-Verteilungskoeffizient und damit wahrscheinlich auch der Zelle/Wasser-Verteilungskoeffizient erhöht wird. Dadurch wird die Adsorption an der Grenzfläche erhöht, was wiederum die Voraussetzung für die Wirkung der polaren bzw. unpolaren Strukturen der Fettsäuren ist (GALBRAITH et al., 1971). BEAN (1967) kam zu ähnlichen Schlüssen bezüglich der Wirkungsweise von Phenolen. Zusatz von $Ca^{2+}$- und $Mg^{2+}$-Ionen hebt die bakterizide Wirkung von Fettsäuren teilweise auf. Dabei kommt es zur Salzbildung mit Fettsäuren sowie Praezipitation und/oder Erhöhung der Grenzflächenspannung an der Zellmembran (GALBRAITH et al., 1971).

Die antibakterielle Aktivität der Fettsäuren hängt entscheidend vom pH-Wert des Mediums ab. GALBRAITH und MILLER (1973a) stellten für Laurinsäure verglichen mit längerkettigen Fettsäuren bei pH 6 die höchste bakterizide Aktivität fest. Bei pH 8 hingegen war Laurinsäure weniger aktiv als Myristin-, Palmitin- und Pentadecanoidsäure. Dieses Phänomen ist zumindest teilweise aus dem Verhältnis von hydrophilen und hydrophoben Gruppen des Fettsäuremoleküls zu erklären.

Hydrophile Eigenschaft ist maßgeblich für die Löslichkeit im wäßrigen Medium, hydrophobe Eigenschaft für die Anheftung der Fettsäuren an die Bakterienzelle (BEAN, 1967; GALBRAITH und MILLER, 1973a), d.h. bei saurem pH-Wert liegen die Fettsäuren in stärkerem Maße undissoziiert vor und die hydrophoben Eigenschaften steigen (der Öl/Wasser-Verteilungskoeffizient steigt). Als Folge verstärkt sich die Affinität zur Bakterienzelle (GALBRAITH und MILLER, 1973a; VADEHRA und HARMON, 1965).

Hinsichtlich der Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration zeigt von den gesättigten Fettsäuren Laurinsäure bei pH 6 die größte Wasserlöslichkeit. Mit steigender Kettenlänge werden die Fettsäuren immer weniger wasserlöslich und nehmen in ihrer bakteriziden Wirkung immer mehr ab, da

sich bei diesem pH-Wert zu wenig Fettsäuremoleküle in Lösung befinden. Die Löslichkeit der Fettsäure hängt vom Grad ihrer Ionisation ab (SPINK, 1963; BAGG, HABER und GREGOR, 1966). Je länger die Ketten, desto alkalischer muß der pH-Wert sein, um die Löslichkeit der Fettsäuren in wäßrigem Medium zu verbessern (SPINK, 1963: BAGG, HABER und GREGOR, 1966). Bei pH 8 liegen die langkettigen Fettsäuren stärker dissoziiert vor, d.h. ihre Wasserlöslichkeit ist größer und es stehen mehr Moleküle für eine Hemmung des Bakterienwachstums zur Verfügung. In diesem pH-Bereich wird nun die Fettlöslichkeit der Fettsäuren für die Anheftung an die Bakterienzelle bestimmend. Die langkettigen Fettsäuren Myristinsäure, Pentadecansäure und Palmitinsäure wurden nach GALBRAITH und MILLER (1973a) im Vergleich zur Laurinsäure aktiver, da erstere aufgrund ihrer höheren Kettenlänge lipophileren Charakter haben und von der Bakterienzelle stärker adsorbiert werden. Unterschiede in der Bindung von Fettsäuremolekülen an die Zellmembran können ebenfalls deren Aufnahme beeinflussen (GALBRAITH und MILLER, 1973a).

SPECTOR und BRENNEMANN (1972) stellten z.B. fest, daß ungesättigte Fettsäuren weniger stark als gesättigte von der Mitochondrienmembran gebunden werden. Die Arbeiten von HUGO (1967) und SALTON (1968) lassen vermuten, daß die antibakterielle Wirksamkeit aufgrund der lipophilen und hydrophilen Aktivitäten auf der Zytoplasmamembran beruht. GILBY und FAW (1957, 1960), GALBRAITH und MILLER (1973b) untersuchten die Lysis von Protoplasten durch oberflächenaktive Agentien und stellten einen Zusammenhang mit deren antibakterieller Aktivität gegenüber ganzen Bakterienzellen her. Auch GALBRAITH und MILLER (1973b) gehen davon aus, daß der Wirkungsort der Fettsäuren die Zytoplasmamembran ist. Bei Untersuchungen an Protoplasten kamen GALBRAITH und MILLER (1973b) zu der Vermutung, daß Fettsäuren ihre die Grenzflächenspannung reduzierenden Eigenschaften zwischen Protoplasten und wäßrigem Medium entfalten, was zu teilweisem Aufbrechen der Membran und eventueller Protoplastenlysis führt.

Nach DANIELLI (1937) ist die Anhäufung von Molekülen an einer Grenzfläche und damit einhergehend die Größe der die Grenzflächenspannung reduzierenden Kräfte abhängig von der Löslichkeit der Moleküle in den beiden Phasen. Kurzkettige Fettsäuren bleiben bei saurem pH-Wert sowohl wasser- als auch lipidlöslich, wohingegen die längerkettigen Fettsäuren sich hauptsächlich in der Protoplastenmembran lösen.

Bei pH 8 liegt Laurinsäure zwar ebenfalls stark ionisiert vor, ist jedoch in niedrigen Konzentrationen nicht ausreichend lipophil. Langkettige Fettsäuren sind ebenfalls stark ionisiert, behalten aber die notwendigen lipophilen Eigenschaften, um die Oberflächenspannung zwischen Lipidstruktur der Membran und dem wäßrigen Medium zu reduzieren, d.h. die Grenzflächenspannung reduzierenden Eigenschaften langkettiger Fettsäuren verstärken sich bei steigendem pH-Wert (DANIELLI 1937, POWNEY und ADDISSON 1938, GALBRAITH und MILLER, 1973b).

GALBRAITH und MILLER (1973b) stellten bei Untersuchungen an isolierten Protoplasten von B. megaterium und M. lysodeikticus fest, daß für das Auslösen einer Lysis bei pH 6 höhere Konzentrationen an Fettsäuren nötig waren als bei pH 8 und erklären dies einerseits durch steigende Aufnahme von Fettsäuren in Abwesenheit negativ geladener Gruppen der Zellwand, die der Aufnahme von Anionen entgegenwirken könnten, andererseits durch die erhöhte Wirksamkeit der die Grenzflächenspannung reduzierenden Kräfte bei pH 8. Als Wirkungsort wird die zytoplasmatische Membran angesehen. Die vergleichsweise größere Resistenz von M. lysodeikticus ist auf eine höhere Zerreißfestigkeit des Protoplasten zurückzuführen. Verschiedene Autoren (HOTCHKISS, 1946; SALTON, 1951, HAMILTON, 1970; HUGO und BLOOMFIELD, 1971; GALBRAITH und MILLER, 1973b) sehen im verstärkten Austreten von Proteinen oder Peptiden aus der Zelle infolge Zerreißens der Zytoplasmamembran einen entscheidenden Faktor für die Lebensfähigkeit der Zelle. Nach HAMILTON (1968) ist allerdings dieser verstärkte Austritt per se

nicht als der ausschlaggebende, antibakteriell wirksame Mechanismus anzusehen.

Nach Untersuchungen von GALBRAITH und MILLER (1973c) stimulieren niedrige Konzentrationen langkettiger Fettsäuren die $O_2$-Aufnahme von Bakterien, höhere, bakterizide Konzentrationen hemmen die $O_2$-Aufnahme irreversibel. Wahrscheinlich wird die Beeinflussung der $O_2$-Aufnahme durch Störung von Phosphorylierungsschritten hervorgerufen, die bei der Desintegration der Zytoplasmamembran auftritt. Im Gegensatz zur irreversiblen Hemmung der Zellatmungsfunktion wird der energieabhängige, membrangebundene Transport von Aminosäuren reversibel gehemmt, wobei die Aufhebung des Effektes durch Zugabe von $Ca^{2+}$ und $Ba^{2+}$-Ionen erreicht werden kann (GALBRAITH und MILLER, 1973c). Nach HAROLD und BAARDA (1968), GALBRAITH und MILLER (1973c) kommt es unter anaeroben Verhältnissen bei Sc. faecalis zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und infolge davon zur Hemmung des energieabhängigen Transportes von Aminosäuren. Dabei wird zwar nicht die Bildung von ATP gehemmt, sondern dessen Bereitstellen für den aktiven Transport. Nach HAROLD und BAARDA (1968), GALBRAITH und MILLER (1973c) kann diese Hemmung durch Veränderung des Protonenflusses infolge einer Änderung der Membranpermeabilität für Protonen bedingt sein. Wenn nach MITCHELL (1966) sowie GALBRAITH und MILLER (1973c) die Energie durch das Transmembranpotential in der Zelle gehalten wird, dann können Fettsäuren das Energiesystem durch Zerstörung der anisotropen Natur der Membran entkoppeln; d.h. Protonen passieren die Membran in beide Richtungen anstatt nur hinausgepumpt zu werden. Dies würde auch erklären, warum Fettsäuren sowohl aerobe als auch anaerobe Bakterien hemmen, da die Hemmung erst nach der ATP-Produktion aufträte.

COLES und LICHSTEIN (1963) sind der Meinung, die Wirkung der Ölsäure beruhe auf einer Permeabilitätsveränderung der Membran, wodurch der intrazelluläre pH-Wert nicht aufrechterhalten werden könnte. Nach SCHOLEFIELD (1963) sowie GAL-

BRAITH und MILLER (1973c) kann eine Hemmung der ATP-Produktion bei Fettsäurekonzentrationen, die die $O_2$-Aufnahme hemmen oder stimulieren, erwartet werden. BROOME et al. (1979) stellten in Gegenwart von Linolensäure bei Sc.lactis-Zellen eine Hemmung des Pyruvatdehydrogenasesystems fest.

Gramnegative Keime, z.B. Ps.phaseolicola und E.coli, die von GALBRAITH und MILLER (1973a) untersucht wurden, sind resistent gegen die antibakterielle Aktivität von Fettsäuren. Diese Widerstandsfähigkeit konnte nicht mit fehlender Adsorption von Fettsäuren erklärt werden - reversible Adsorption konnte nachgewiesen werden. HAMILTON (1970) erklärt die Resistenz der Gramnegativen mit dem besonderen Aufbau ihrer Zellwand, die eine Wirkung antibakterieller Substanzen auf die tieferliegende empfindliche zytoplasmatische Membran verhindert.

## 3. Eigene Untersuchungen

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, durch in-vitro-Versuche abzuklären:

a) ob und inwieweit freie Fettsäuren die Vermehrung verschiedener, in Milch und Milchprodukten häufiger anzutreffenden Bakterien beeinflussen und

b) mit welchen Methoden ein solcher Einfluß nachgewiesen werden kann.

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Bakterien

Folgende technologisch wichtigen Keime, Indikator-Mikroorganismen, Verderbniserreger und pathogene Keime wurden in die Versuche einbezogen:

Streptococcus (Sc.) lactis,
Lactobacillus (L.) helveticus,
Escherichia (E.) coli,
Clostridium (C.) tyrobutyricum,
Proteus (P.) vulgaris,
Pseudomonas (Ps.) sp.,
Bacillus (B.) cereus und
Staphylococcus (S.) aureus

(Alle Kulturen aus der Stammsammlung des Institutes).

#### 3.1.2 Freie Fettsäuren (FFA)

Die FFA wurden von der Firma Sigma bezogen. Ihr Reinheitsgrad lag nach den Angaben des Herstellers bei 99,9 %. Im einzelnen handelte es sich um die gesättigten FFA Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure,

die einfach ungesättigte Ölsäure, die zweifach ungesättigte Linolsäure sowie die dreifach ungesättigte Linolensäure. Die FFA wurden in ihrer Wirkung auf die Mikroorganismen sowohl einzeln als auch in verschiedenen Kombinationen getestet. Die Auswahl der FFA und die eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an den von THAKUR et al. (1974) gemachten Angaben über FFA-Gehalte in Käse. Details finden sich bei den Beschreibungen der jeweiligen Versuchsreihen.

## 3.2 Methodik

Zur Bestimmung der in-vitro-Wirkung auf ausgewählte Bakterienspecies wurden die Keime sowohl in flüssigen als auch in festen Medien dem Einfluß von FFA ausgesetzt. Eventuelle inhibitorische Effekte (Wachstumsförderung war nach den im Schrifttum gefundenen Angaben nicht zu erwarten) sollten mit Keimzählungsverfahren, optischen Verfahren und der ursprünglich zur Qualitätskontrolle mikrobiologischer Nährböden entwickelten ökometrischen Technik (MOSSEL et al., 1980) ermittelt werden. In der Regel wurden diese Untersuchungen an vitalen Keimen, in einigen Versuchsreihen auch an hitzegestreßtem B.cereus durchgeführt. Um die so erzielten Resultate mit Angaben aus dem Schrifttum vergleichen zu können, wurden die FFA den jeweiligen Medien, zum Teil auch vor dem Autoklavieren, zugesetzt. Ob und inwieweit diese Hitzebehandlung für die Konzentrationen (Flüchtigkeit) der FFA bzw. deren chemische Veränderung Konsequenzen hatte, sollte in einigen orientierenden Untersuchungen abgeklärt werden.

### 3.2.1 Untersuchungen zur Wirkung freier Fettsäuren auf Bakterien in flüssigen Kulturmedien

#### 3.2.1.1 Messung der Wirkung über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten bzw. den Wachstumsindex

In dieser Versuchsreihe sollte geklärt werden, welchen Einfluß verschiedene FFA auf das Wachstum von S.aureus und E. coli in einer Nährbouillon (Standard I Nährbouillon, Fa. Merck) haben. Eingesetzt wurden die FFA Myristinsäure (520 ppm), Palmitinsäure (1060 ppm), Stearinsäure (420 ppm) sowie diese drei FFA zusammen in Kombination mit Laurinsäure (110 ppm), ferner Myristin- und Palmitinsäure ebenfalls kombiniert mit Laurinsäure (Konzentrationen der Mischungskomponenten wie bei den einzelnen FFA). Da höhermolekulare FFA in Wasser nicht löslich sind, wurde als Lösungsvermittler ein 5%iges n-Hexan-Ethanol-Gemisch (1/1, beides Fa. Merck) eingesetzt. Die Verteilung der FFA war, wie einige orientierende Versuche zeigten, mit diesem Lösungsvermittler allerdings nicht optimal, so daß in einer zusätzlichen Versuchsreihe Triton X-100 (0,1%ig, Fa. Sigma) als Emulgator getestet wurde. In diese Untersuchungen waren eingeschlossen: Caprinsäure (97 ppm), Laurinsäure (110 ppm), Stearinsäure (420 ppm), Ölsäure (930 ppm) sowie Kombinationen von Caprin-, Linol- und Ölsäure (Konzentrationen der Mischungskomponenten wie bei den einzelnen FFA). Die Testkeime wurden zunächst in 50 ml Standard I Nährbouillon über 18 Std. bei 37°C angezüchtet. E.coli vermehrte sich unter diesen Bedingungen auf ca. $10^8$ - $10^9$, S.aureus auf ca. $10^{10}$ - $10^{11}$ Keime/ml. Aus diesen Kulturen wurden in mehreren Parallelansätzen jeweils 0,2 ml in

a) 200 ml Standard I Nährbouillon ohne jeden Zusatz,
b) 200 ml Standard I Nährbouillon mit 5%igem n-Hexan/Ethanol-Gemisch bzw. 0,1%igem Triton X-100 und
c) 200 ml Standard I Nährbouillon mit den oben genannten FFA

im Lösungsmittler bzw. Emulgator einpipettiert. Der Zusatz der FFA erfolgte sowohl nach als auch vor dem Autoklavieren (121° C / 20 min) der Nährbouillon. Alle Ansätze wurden anschließend bei 37°C/24 Std./200 upm in einem Schüttelbrutschrank (Fa. New Brunswick Scientific) inkubiert, um so eine Anreicherung der FFA auf der Oberfläche der Nährbouillon zu verhindern. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml Bouillon mit dem Koch'schen Gußplattenverfahren entsprechend DIN 10192 (Teil 1), Mikrobiologische Milchuntersuchung, Bestimmung der Keimzahl, Referenzverfahren.

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurden analog zu dem oben geschilderten Verfahren die Testkeime der Einwirkung der FFA ausgesetzt, allerdings unter Einbeziehung von Sc. lactis, L.helveticus und Ps.sp. und unter Erweiterung des FFA-Spektrums. Folgende FFA bzw. Kombinationen wurden verwendet:

Caprinsäure (97 ppm), Laurinsäure (110 ppm), Ölsäure (930 ppm), Linolsäure (220 ppm) und Linolensäure (220 ppm) sowie die Kombinationen

1) Caprinsäure (97 ppm) + Laurinsäure (110 ppm) + Linolsäure (220 ppm) + Linolensäure (220 ppm) +
2) Caprinsäure (48 ppm) + Laurinsäure (55 ppm) + Linolsäure (110 ppm) + Linolensäure (110 ppm) +
3) Caprinsäure (32 ppm) + Laurinsäure (37 ppm) + Linolsäure (73 ppm) + Linolensäure (73 ppm) +
4) Carpinsäure (24 ppm) + Laurinsäure (27 ppm) + Linolsäure (55 ppm) + Linolensäure (55 ppm)

Als Lösungsmittel diente Ethanol (Endkonzentration 0,5 %).

In diesen Untersuchungsreihen wurden die Auswirkungen auf die Vermehrung der Keime nicht wie oben beschrieben über die Ermittlung der koloniebildenden Einheiten, sondern mit der ökometrischen Technik bestimmt. Hierzu erfolgte nach der

Bebrütung (24 Std.) bei 30°C (Sc. lactis, Ps.sp.) bzw. 37°C (übrige) auf dem wie unter 3.2.2.2 vorbereiteten Plate-Count-Agar das Anlegen von Ausstrichen und nach der Inkubation (48 Std./30° C bzw. 37°C) die Bestimmung der Wachstumsindices.

3.2.1.2 Messung der Wirkung mit einem optischen Verfahren

In den im folgenden beschriebenen Experimenten wurde der Einfluß von Caprinsäure, Laurinsäure, Linolsäure und Linolensäure (allein, kombiniert und in verschiedenen Konzentrationen; siehe hierzu Abb. 6-20) auf die Vermehrung von Sc. lactis, L. helveticus, E.coli, Ps. sp., B. cereus und S. aureus in Nährbouillon untersucht. Als Lösungsvermittler diente Ethanol; das Keimwachstum wurde in Anlehnung an ein bei MACASKIE (1982) geschildertes Verfahren optisch gemessen.

Die FFA bzw. ihre Kombinationen wurden nach dem Autoklavieren mit Ethanol (Endkonzentration 0,5%) zu jeweils 30 ml Nährbouillon gegeben und zum Erreichen einer möglichst gleichmäßigen Verteilung 2 - 3 Std. bei 37°C und 200 upm geschüttelt. Anschließend erfolgte der Zusatz von 0,1 ml der entsprechenden, wie unter 3.2.1.1 hergestellten Testkultur, und nach gründlichem Homogenisieren die erste optische Messung mit einem Zeiss-Spectralphotometer PM 6 bei 680 nm. Weitere Messungen wurden nach 3, 6, 8 und 24 Std. Bebrütung im Schüttler bei 30°C (Sc. lactis, B. cereus, Ps. sp.) bzw. 37°C (L. helveticus, E.coli, S. aureus) und 200 upm durchgeführt. Der Einfluß des Lösungsvermittlers allein auf die genannten Keime wurde ebenfalls in der oben beschriebenen Weise geprüft, parallel auch stets ein Ansatz ohne FFA und Ethanol (Abb. 4, 5).

### 3.2.1.3 Wirkung von freien Fettsäuren auf hitzegestreßten B. cereus

Die Hitzebelastung vegetativer B.cereus-Formen erfolgte in Anlehnung an ein bei RAPPAPORT und GOEPFERT (1979) beschriebenes Verfahren. Hierbei wird die Kultur zunächst über Nacht in 10 ml Hirn-Herz-Dextrose-Bouillon (Brain Heart Infusion, Fa. Oxoid) bei 30°C angezüchtet. 3 ml dieser Anzüchtung werden in 27 ml des gleichen, auf 30°C vorgewärmten Mediums übergeführt und im Schüttelbrutschrank 4 Std. bei 30°C und 80 upm inkubiert. Dieses Verfahren soll nach den Angaben der oben genannten Verfasser eine Kultur mit 1 Spore/$10^6$ vegetativen Zellen erbringen. Das Material wird anschließend bei 10 000 upm und 2°C für 10 min zentrifugiert, das Sediment in 0,1 M Kaliumphosphat Puffer (pH 6,0) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes und Suspendieren des Sedimentes in 10 ml Puffer enthält die Suspension 1 - 3 x$10^9$ Keime/ml. Zur Belastung werden hiervon 3 ml in 27 ml auf 47°C vorgewärmten Puffer übertragen und in einem Schüttelwasserbad bei 120 upm für 5 - 10 min erhitzt. Zur Auswahl einer geeigneten Erhitzungszeit (zwischen 5 und 10 min) wurden nach jeweils 1 min Mengen von 1 ml entnommen, in 0,1%igem Peptonwasser dezimale Verdünnungsreihen angelegt, 0,1 ml einer jeden Verdünnung auf Plate-Count-Agar und dem gleichen Nährboden mit 2,5 % Kochsalzzusatz ausgespatelt und nach 24 Std. Bebrütung bei 30°C die Differenz der koloniebildenden Einheiten auf den beiden Nährböden ermittelt. Nach einer Schädigungsdauer von 7 min erfolgte eine Reduktion der Keime auf Plate-Count-Agar mit 2,5% Kochsalz um ca. 2 Zehnerpotenzen, so daß diese Zeit für die Durchführung der eigentlichen Versuche gewählt wurde. Zu diesem Zweck wurden 0,1 ml der 7 min lang in der oben beschriebenen Weise geschädigten Kultur in 30 ml Nährbouillon überimpft, der Caprinsäure (97 ppm), Laurinsäure (110 ppm) oder Linolsäure (220 ppm) zugesetzt worden waren. Nach 24 Std. Bebrütung erfolgte die optische Messung des Wachstums (siehe 3.2.1.2) und der Vergleich mit einem Ansatz ohne FFA.

3.2.1.4 Wirkung von freien Fettsäuren auf C.tyrobutyricum

Die Wirkung folgender FFA auf das Wachstum von C.tyrobutyricum wurde getestet: Caprin- (97 ppm, 388 ppm), Laurin- (110 ppm) und Linolsäure (220 ppm) mit Ethanol (Endkonzentration 0,5%) als Lösungsmittel.

Aus einer Anzüchtung von C.tyrobutyricum in Nährbouillon (10 ml, mit Paraffin überschichtet, 48 Std./37°C) wurden jeweils 0,1 ml in Röhrchen mit 10 ml Nährbouillon pipettiert (Ansatz mit den oben genannten FFA und Ethanol, Ansatz nur mit C.tyrobutyricum), mit Paraffin überschichtet und 48 Std. bei 37°C bebrütet. Jeweils 1 ml dieser Anzüchtungen wurden in Zehnerstufen mit Ringer-Lösung (Fa. Oxoid) verdünnt und aus jeder Verdünnungsstufe 1 ml zu 9 ml DRCM-Bouillon (Fa. Oxoid) gegeben (Parallelansatz). Nach 48 Std. Bebrütung bei 37°C erfolgte die Ablesung des Wachstumstiters anhand der Schwärzung des Mediums.

3.2.2 Untersuchungen zur Wirkung freier Fettsäuren auf Bakterien in festen Kulturmedien

3.2.2.1 Messung der Wirkung über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

In diesem Versuchsabschnitt wurden folgende FFA allein und in Kombinationen geprüft:

Caprinsäure (97 ppm), Laurinsäure (110 ppm),
Laurinsäure (110 ppm) + Ölsäure (930 ppm)

a) Caprinsäure (97 ppm) + Laurinsäure (110 ppm) + Ölsäure (930 ppm) + Linolsäure (220 ppm)

b) Caprinsäure (388 ppm) + Laurinsäure (440 ppm) + Ölsäure (3720 ppm) + Linolsäure (880 ppm)

c) Caprinsäure (388 ppm) + Laurinsäure (440 ppm) + Linolsäure (880 ppm)

d) Caprinsäure (388 ppm) + Laurinsäure (440 ppm)

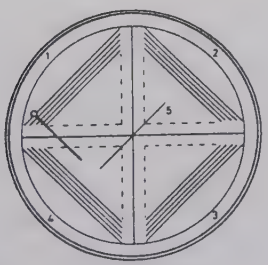
Als Testkeime dienten Sc. lactis, E. coli, P. vulgaris und S. aureus, als Emulgator Triton X-100 (0,1%ig).

Die FFA bzw. ihre Kombinationen wurden nach dem Lösen der Plate-Count-Agar-Ingredienten (Fa. Oxoid CM 325) diesem zusammen mit dem Emulgator zugesetzt und autoklaviert. Von den in jeweils 50 ml Nährbouillon 18 St. bei 30°C (Sc.lactis) bzw. 37°C (alle übrigen oben genannten Keime) inkubierten Kulturen wurden dezimale Verdünnungen angelegt und in Petrischalen aus jeder Verdünnungsstufe 1 ml mit 10 ml des auf ca. 45°C abgekühlten Nährbodens vermischt. Als Bezugsgröße diente für jeden Testkeim der Ansatz ohne FFA. Außerdem wurde jeweils ein Ansatz nur mit dem Emulgator durchgeführt. Die Platten wurden nach dem Erstarren bei 30°C (Sc. lactis) bzw. 37°C (übrige) bebrütet und nach 48 Std. die Kolonien ausgezählt.

3.2.2.2 Messung der Wirkung mit der ökometrischen Technik

Die ökometrische Technik basiert nach MOSSEL et al. (1980) auf einer Abnahme der koloniebildenden Einheiten in aufeinanderfolgenden Arealen der Nährbodenoberfläche.

Abbildung 1: Beimpfung des Nährbodens bei Anwendung der ökometrischen Technik



Der Nährboden wird wie in Abb. 1 dargestellt beginnend in Quadrant 1 mit einer Öse beimpft, ohne diese zwischen der Inokulation der einzelnen Quadranten abzuflammen. Die in der Abbildung mit 5 gekennzeichnete Linie besteht nur noch aus einem einzelnen Impfstrich. Nach der Bebrütung werden die in den einzelnen Quadranten mit Kolonien des Testkeimes bewachsenen Impfstriche (wieder beginnend mit Quadrant 1) ausgezählt, wobei jedem dieser Impfstriche der Wert 0,2 zuzuordnen ist. Sind beispielsweise in Quadrant 1 und 2 alle Impfstriche bewachsen, in Quadrant 3 nur vier, so ergibt sich ein Wachstumsindex von 2,8. Der höchste Wachstumsindex liegt dementsprechend bei 4,2.

In den eigenen Untersuchungen wurde mit der ökometrischen Technik der Einfluß der verschiedenen FFA allein und in Kombination auf Sc. lactis, E. coli, P. vulgaris und S. aureus geprüft. Im einzelnen handelte es sich um folgende FFA bzw. Kombinationen:

Caprinsäure (97 ppm, 388 ppm, Laurinsäure (110 ppm, 440 ppm), Ölsäure (930 ppm), Linolsäure (220 ppm),

Laurinsäure (110 ppm)
Laurinsäure (220 ppm)
Linolsäure (220 ppm)
Caprinsäure (194 ppm)
} + Ölsäure (930 ppm)

sowie die unter 3.2.2.1 mit a) bis d) gekennzeichneten Fettsäurenkombinationen.

Als Nährboden diente Plate-Count-Agar (Fa. Oxoid, CM 325), als Emulgator Triton X-100 (0,1%). Dem Nährboden wurden nach dem Lösen die oben genannten FFA bzw. Kombinationen im Emulgator zugesetzt und im Anschluß an das Autoklavieren und Abkühlen Petrischalen mit jeweils 25 ml des Mediums beschickt. Auf die gut getrockneten Nährböden (20 Std./37°C) erfolgten aus den 18 Std. bei 30°C (Sc. lactis) bzw. 37°C (E. coli, P. vulgaris, S. aureus) in je 50 ml Nährbouillon angezüchteten

Kulturen mit einer 0,01 ml fassenden Impföse Ausstriche in der in Abb. 1 angegebenen Weise (Parallelansätze). Nach einer Inkubation von 48 Std. bei 30°C (Sc. lactis) bzw. 37°C (übrige) wurde wie oben beschrieben der Wachstumsindex ermittelt. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne FFA bzw. nur mit Zusatz von Emulgator.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Untersuchungen zur Wirkung freier Fettsäuren auf Bakterien in flüssigen Kulturmedien

#### 3.3.1.1 Messung der Wirkung über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten bzw. den Wachstumsindex

In dieser Versuchsreihe konnte eine Wirkung von FFA auf die Vermehrung von S. aureus und E. coli bei 37° C nicht nachgewiesen werden. Unabhängig von den geprüften FFA, ihren Konzentrationen und Kombinationen und vom Lösungsvermittler bzw. Emulgator (s. 3.2.1.1) stiegen die Ausgangskeimzahlen bei S. aureus von $1,2 \times 10^6$/ml nach 48stündiger Bebrütung auf $9 \times 10^9$/ml (Mittelwerte). E. coli vermehrte sich von $1,3 \times 10^6$ Keimen/ml bei der Ausgangsuntersuchung auf ca. $5 \times 10^9$ Keime/ml nach 24 Std. (Mittelwert). Dies entsprach der Wachstumskinetik bei Ansatz ohne FFA und Lösungsvermittler/Emulgator bzw. mit Lösungsmittler/Emulgator allein.

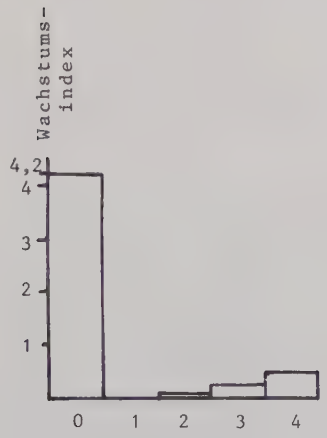
Bei der Ermittlung der Wirkung von FFA auf E. coli, S. aureus, Sc. lactis, L. helveticus und Ps. sp. durch Bestimmung des Wachstumsindex (s. 3.2.1.1) ergab sich bei Prüfung einzelner Fettsäuren, daß E. coli und Ps. sp. gegen keine der FFA (Caprin-, Laurin-, Öl-, Linol- und Linolensäure) in den eingesetzten Konzentrationen (s. 3.2.1.1, letzter Absatz) empfindlich war. S. aureus wurde durch Linolensäure (220 ppm) völlig gehemmt, Linolsäure (220 ppm) senkte den Wachstumsindex von 4,2 bei Ansatz ohne FFA auf 0,4. Wurde S. aureus 24 Std. lang bebrütet, so erreichte er in Gegenwart von Laurinsäure (110 ppm)

nur einen Wachstumsindex von 0,8. Nach Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Std. stieg er dagegen auf 4,0 an. Die übrigen FFA waren ohne Einfluß (Wachstumsindex 4,2). Sc. lactis vermehrte sich in Anwesenheit von Linol- und Linolensäure nicht, Laurinsäure (110 ppm) verminderte den Wachstumsindex von 4,2 (Ansatz ohne FFA) auf 2,4, Caprin- und Ölsäure zeigten keine Wirkung. L. helveticus war ebenfalls gegen Linolsäure (220 ppm) und Laurinsäure (110 ppm) empfindlich (Wachstumsindex 3,2 bzw. 0,6). Linolensäure (220 ppm) unterdrückte die Vermehrung völlig, die sonstigen FFA blieben wirkungslos. Das bei allen Versuchen als Lösungsvermittler mitgeführte Ethanol zeigte bei keiner der getesteten Bakterienspecies einen hemmenden Effekt, so daß bei den weiteren, in diesem Versuchsabschnitt durchgeführten Experimenten auf einen Ansatz mit Ethanol allein verzichtet wurde.

Ein etwas anderes Bild als oben geschildert ergab sich bei Einsatz der Fettsäurekombinationen (3.2.1.1, letzter Absatz), sieht man ab von E. coli und Ps. sp., die auch gegenüber diesen unempfindlich waren. Die Ergebnisse der Untersuchungen an L. helveticus und S. aureus sind in Abb. 2 und 3 dargestellt. Sc. lactis wurde mit allen Kombinationen vollständig gehemmt.

Bei L. helveticus und S. aureus konnte dagegen eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden (Abb. 2 und 3). Auffallend war, daß S. aureus, dessen Wachstumsindex nach weiterer Bebrütung von 24 Std. erneut bestimmt wurde, in seiner Vermehrung nach dem Zeitraum von nunmehr 48 Std. Inkubationszeit eine deutliche Erhöhung des Index zeigte. Dies galt allerdings nur für relativ geringe FFA-Konzentrationen (Abb. 3).

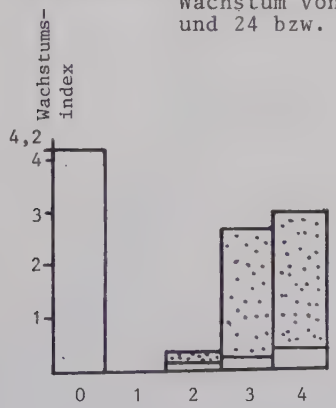
Abbildung 2: Einfluß von Fettsäurenkombinationen auf das Wachstum von L.helveticus in Nährbouillon bei 37°C und 24 Std. Bebrütung




0 = Ansatz ohne FFA

1 - 4 = FFA-Kombinationen
(s. 3.2.1.1, S. 26)

Abbildung 3: Einfluß von Fettsäurenkombinationen auf das Wachstum von S.aureus in Nährbouillon bei 37°C und 24 bzw. 48 Std. Bebrütung




= Ermittlung des Wachstums-index nach 24 Std.

= Ermittlung des Wachstums-index nach 48 Std.

0 = Ansatz ohne FFA

1 - 4 = FFA-Kombinationen
(s. 3.2.1.1, S. 26)

3.3.1.2 Messung mit einem optischen Verfahren

Die Ergebnisse des gesamten unter 3.3.1.2 beschriebenen Versuchsabschnittes sind in den Abb. 6 bis 20 dargestellt. Die Abb. 6 bis 11 zeigen den Einfluß einzelner freier Fettsäuren in Nährbouillon auf die Vermehrung von Sc. lactis, L. helveticus, E. coli, Ps. sp., B. cereus und S. aureus.

Wie schon bei den unter 3.3.1.1 geschilderten Ergebnissen für Sc. lactis, L. helveticus, E. coli, Ps. sp. und S. aureus festgestellt, war auch bei diesen Versuchen für die genannten Keime sowie für B. cereus kein wachstumshemmender Effekt durch den Lösungsvermittler Ethanol zu registrieren (Abb. 4 und 5). Als unempfindlich gegen die jeweils getesteten Fettsäuren erwiesen sich E. coli (Caprin-, Laurin-, Linolsäure) und Ps. sp. (Caprin-, Laurin-, Linol-, Linolensäure) (Abb. 8 und 9). Schlüsselt man die in den Abbildungen dargestellten Resultate nach den einzelnen Fettsäuren auf, so ergibt sich für die verbleibenden Testkeime folgendes Bild.

Caprinsäure (97 ppm) wirkte kaum bzw. nicht wachstumshemmend auf Sc. lactis und L. helveticus (Abb. 6 und 7), beeinflußte die Vermehrung von S. aureus leicht (Abb. 11) und die von B. cereus nach ca. 6 Std. Bebrütung deutlich (Abb. 10).

Abbildung 4: Einfluß von Ethanol (0,5 %) auf das Wachstum von L. helveticus und S. aureus in Nährbouillon bei 37°C

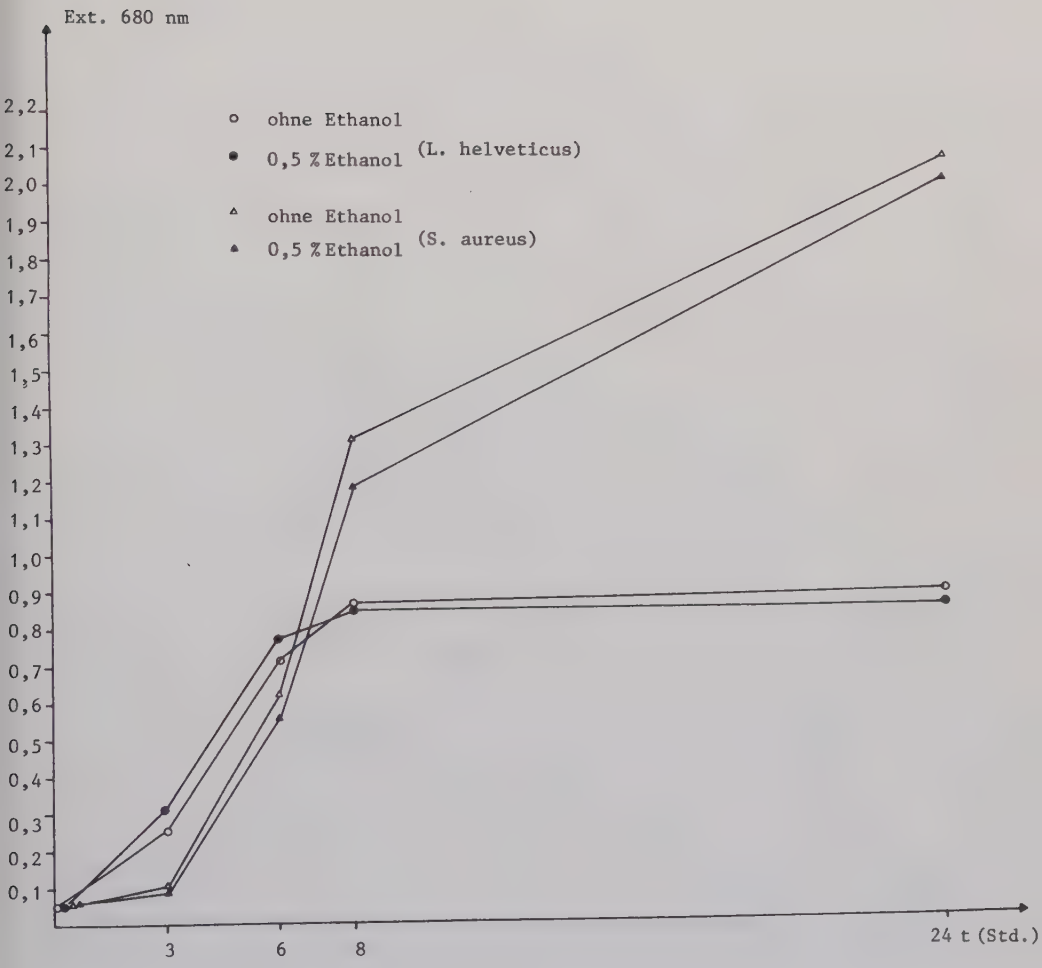


Abbildung 5: Einfluß von Ethanol (0,5 %) auf das Wachstum von Sc. lactis und B. cereus in Nährbouillon bei 30°C

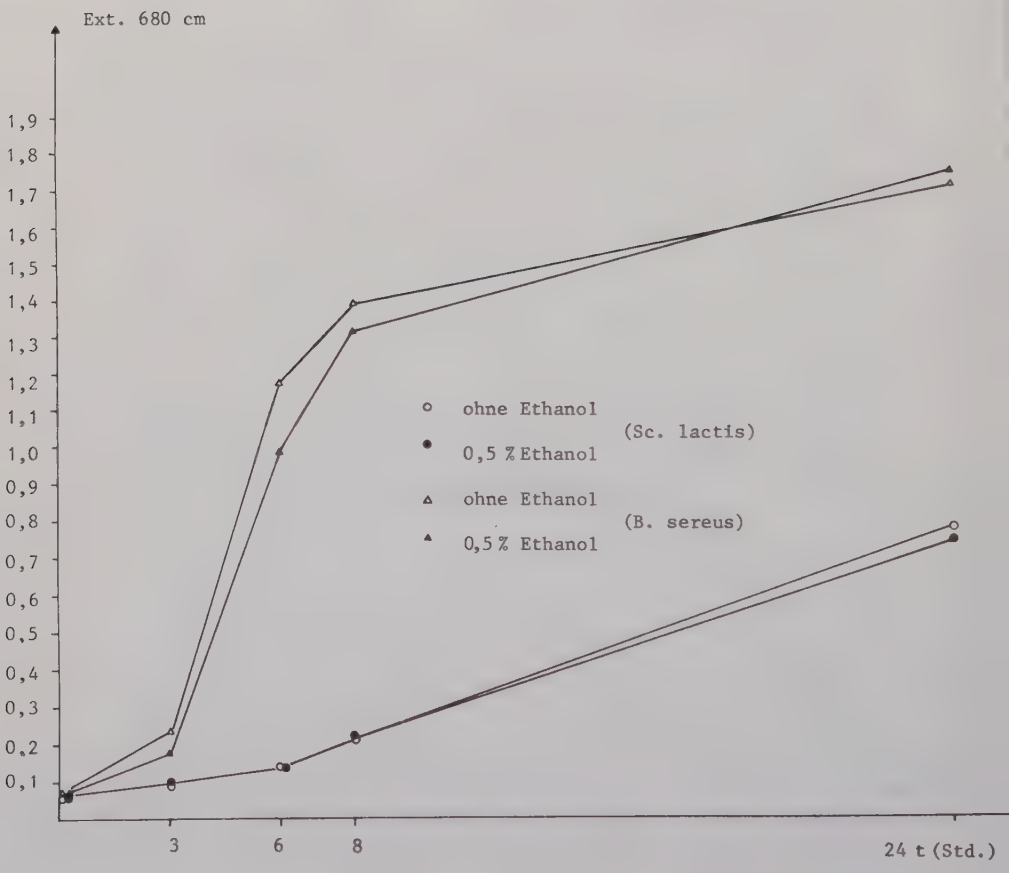


Abbildung 6: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von Sc. lactis in Nährbouillon bei 30°C

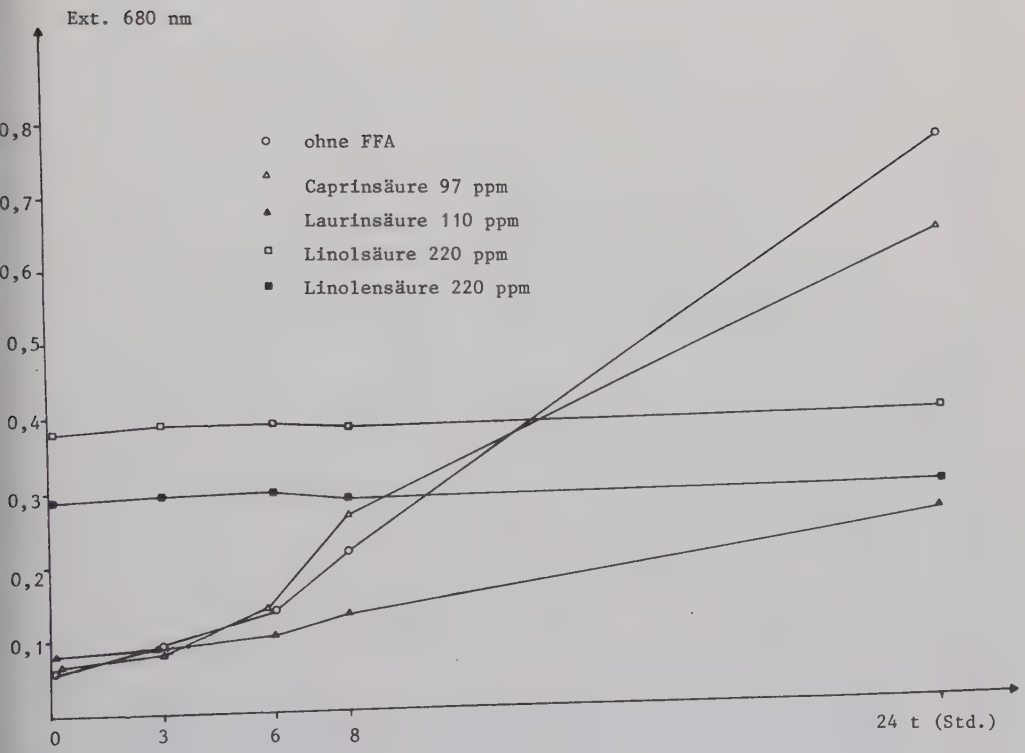


Abbildung 7: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von L. helveticus in Nährbouillon bei 37°C

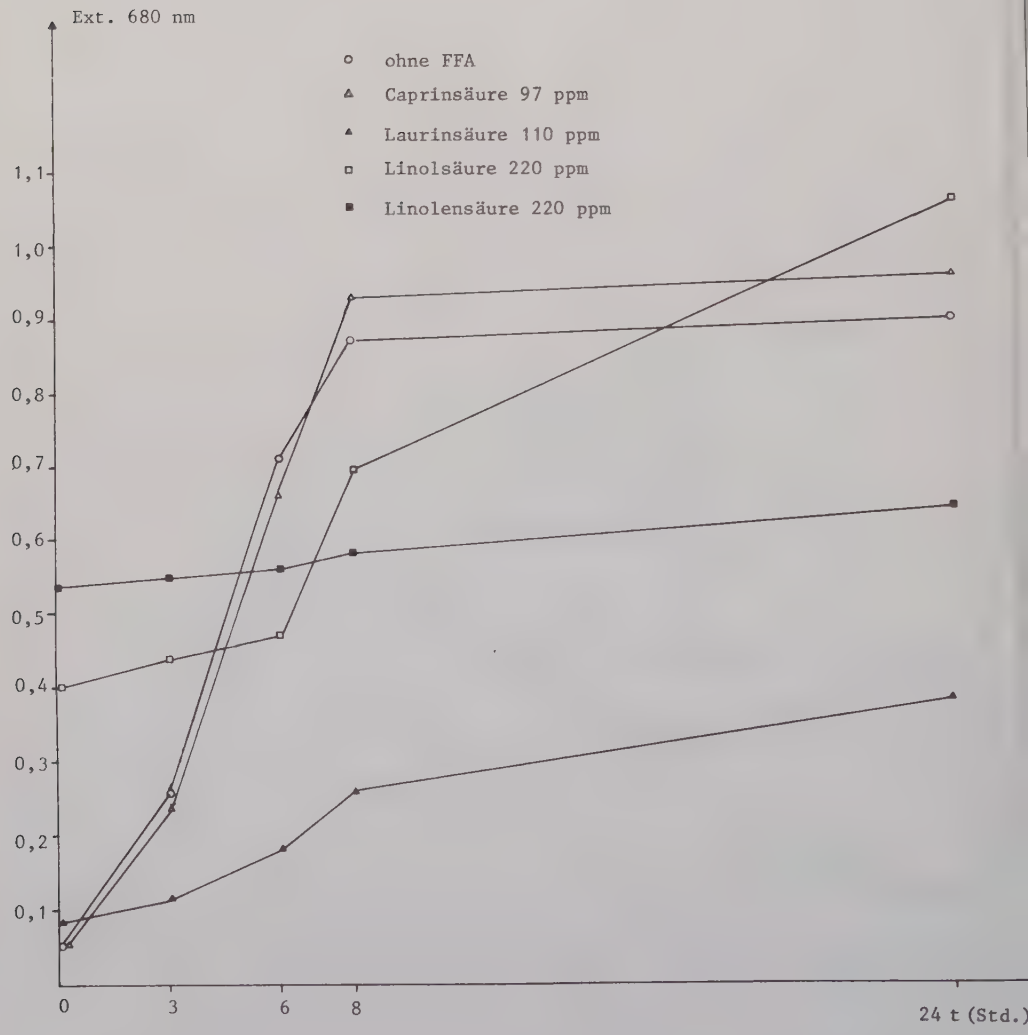


Abbildung 8: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von E. coli in Nährbouillon bei 37°C

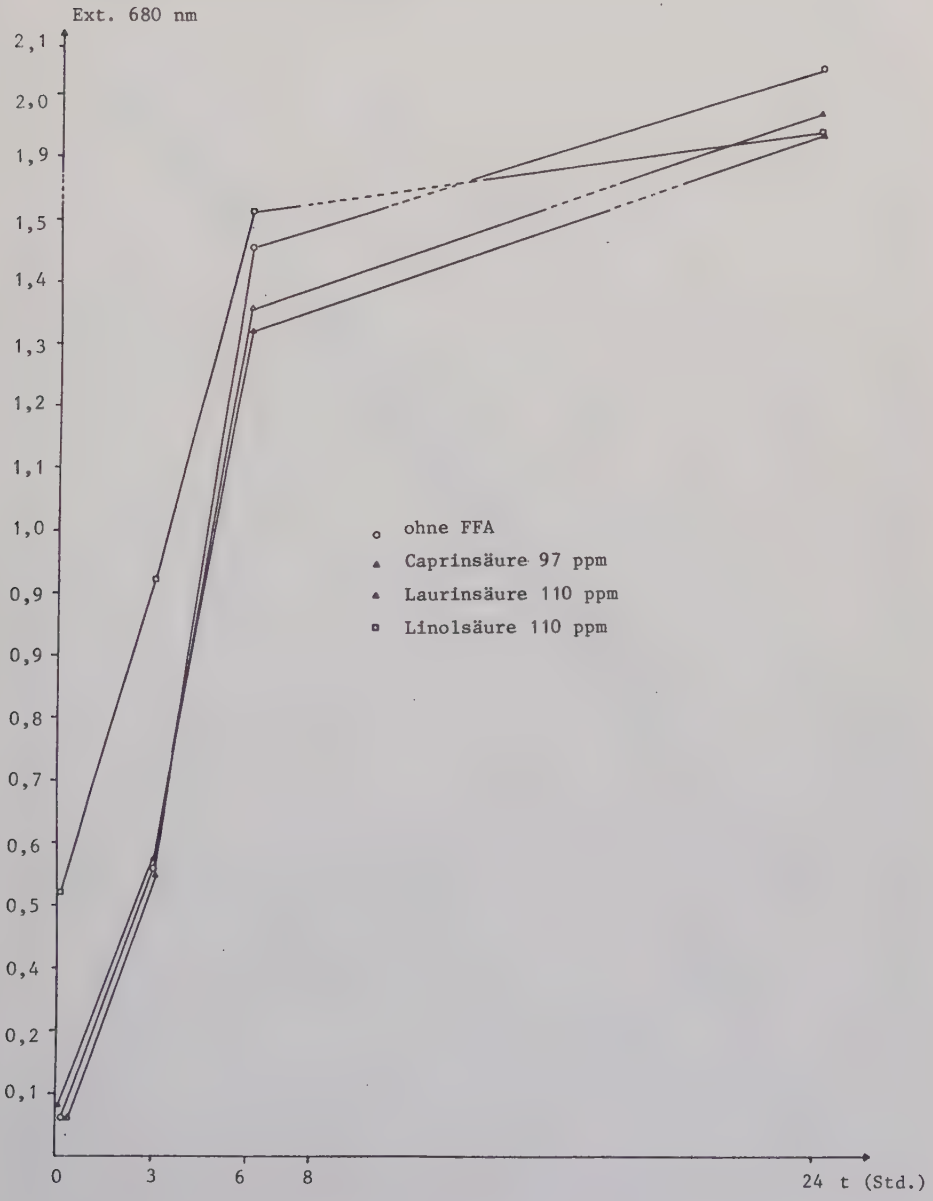


Abbildung 9: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von Pseudomonas sp. in Nährbouillon bei 30°C

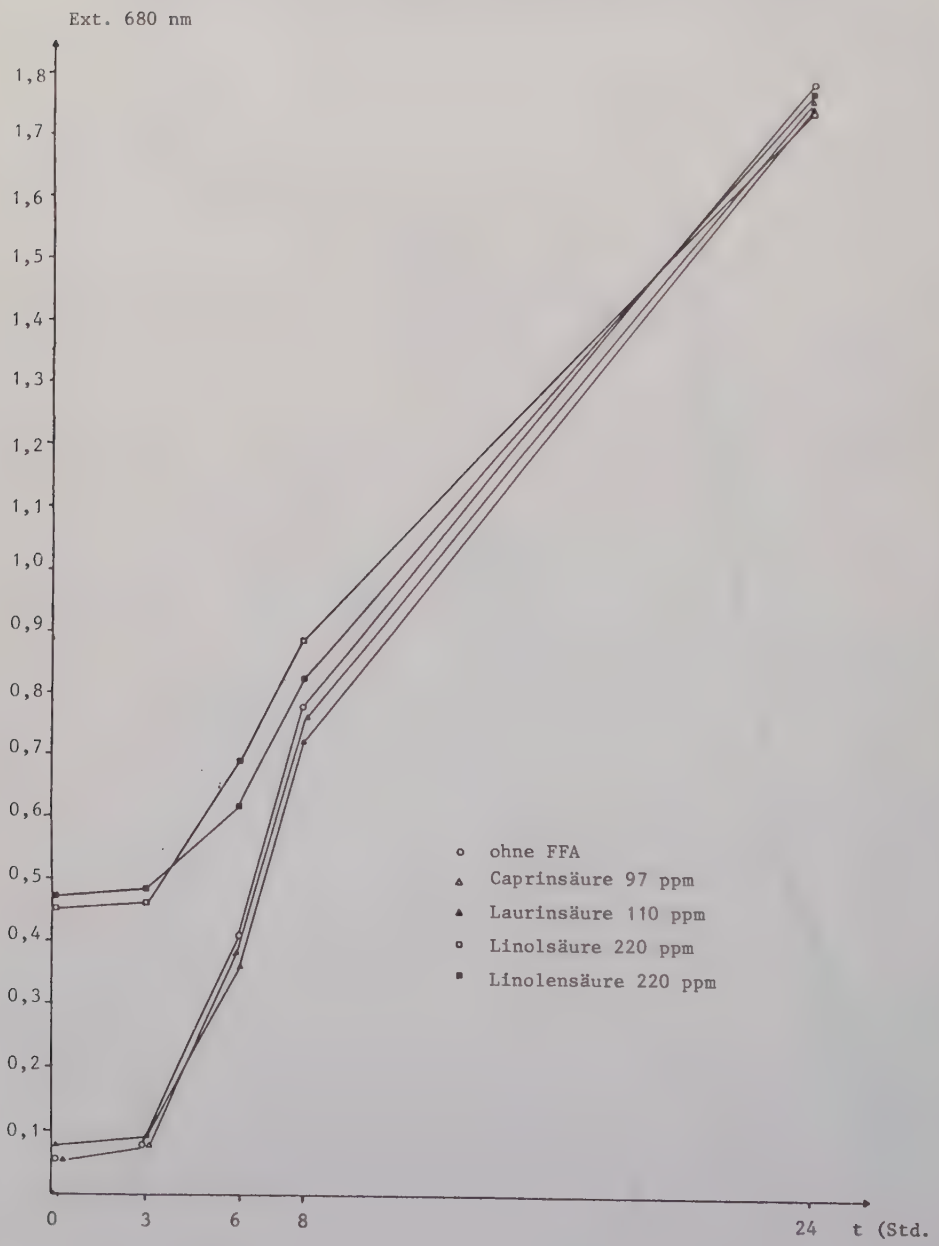


Abbildung 10: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von B. cereus in Nährbouillon bei 30°C

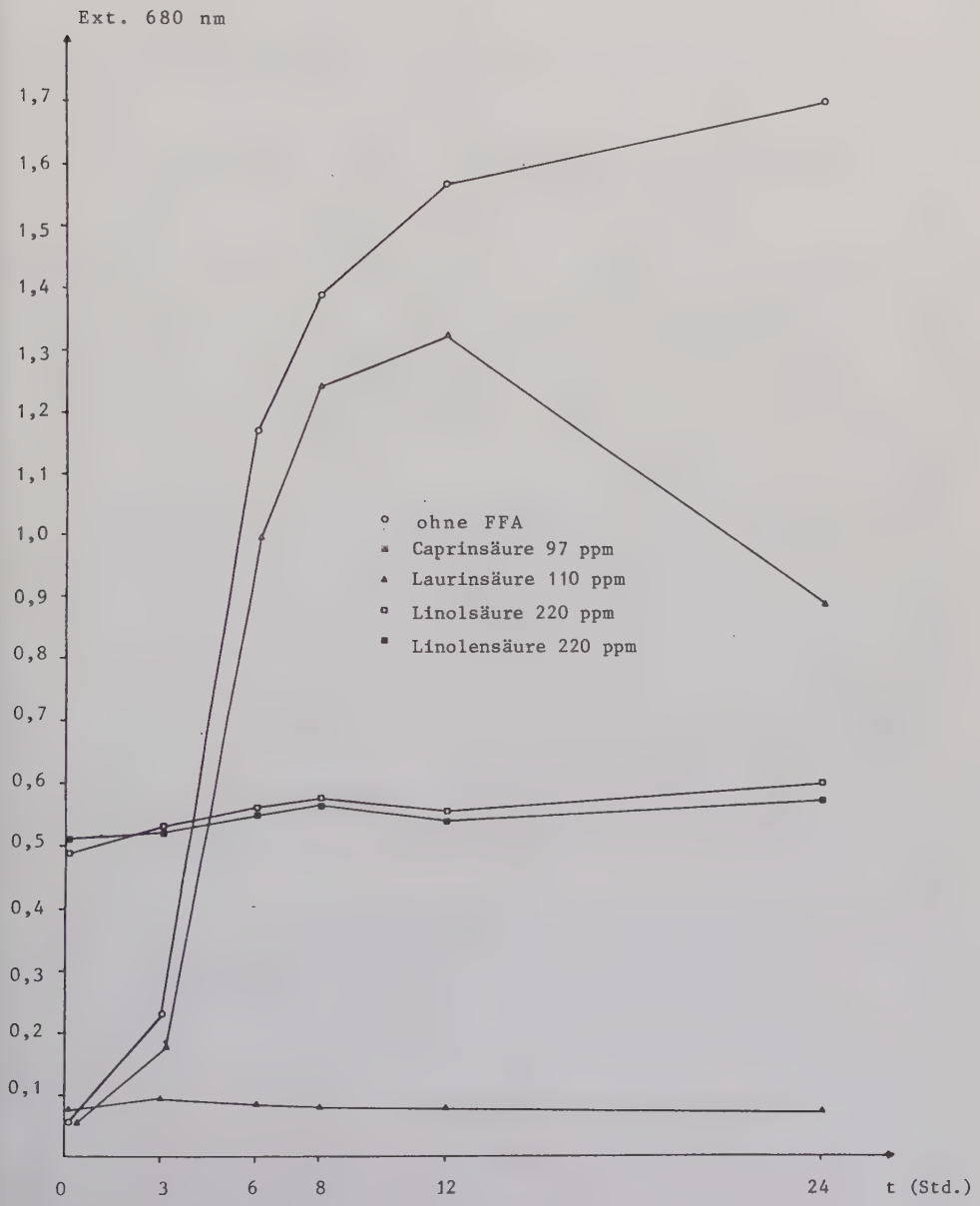
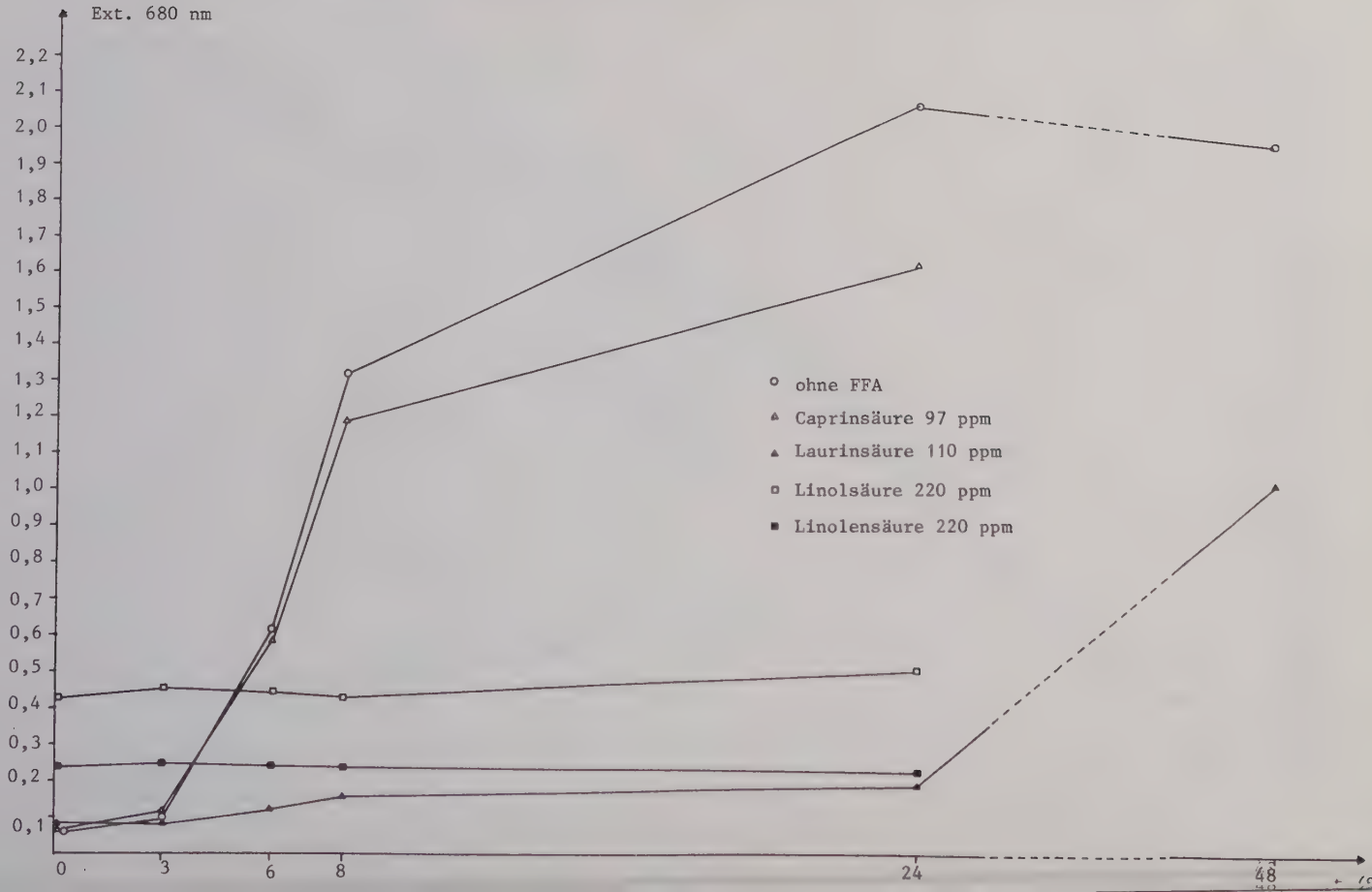


Abbildung 11: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von S.aureus in Nährbouillon bei 37°C



Laurinsäure (110 ppm) hemmte Sc. lactis und L. helveticus relativ stark (Abb. 6 und 7) und unterdrückte das Wachstum von B. cereus völlig. S. aureus entwickelte, wie schon unter 3.3.1.1 festgestellt, gegenüber Laurinsäure nach anfänglicher Empfindlichkeit bei Verlängerung der Inkubationszeit eine gewisse Toleranz (Abb. 11).

Linol- und Linolensäure (220 ppm) hemmten Sc. lactis, B. cereus und S. aureus nahezu völlig, nur L. helveticus zeigte in Gegenwart von Linolsäure leichtes Wachstum.

Da sich die FFA Laurin-, Linol- und Linolensäure somit als gegen die grampositiven Keime am stärksten wirksam erwiesen hatten, wurde in einigen weiterführenden Experimenten ihr Einfluß auch in anderen Konzentrationen auf L. helveticus, B. cereus und S. aureus geprüft. Die Ergebnisse finden sich in den Abb. 12 bis 14.

Laurinsäure in einer Konzentration von 220 ppm unterdrückte das Wachstum aller drei Testkeime vollständig. Gleiches galt für S. aureus in Gegenwart von Linolsäure (110 ppm), während die Vermehrung von L. helveticus und B. cereus zwar zunächst verzögert wurde, nach 24 Std. aber Anstiege der Extinktionen zu verzeichnen waren (Abb. 12 u. 13). Linolensäure bewirkte unabhängig von der eingesetzten Konzentration (55 und 110 ppm) eine völlige Wachstumshemmung bei allen drei Testkulturen (Abb. 12, 13, 14). Interessant war die Tatsache, daß bei S. aureus ein Zusatz von Ölsäure (232 ppm) diese Hemmung nach anfänglicher Verzögerung der Vermehrung bedeutend reduzierte (Abb. 15).

In den Abbildungen 16 bis 20 finden sich die Ergebnisse der Prüfung des Einflusses verschiedener Fettsäurenkombinationen auf die oben genannten Keime. E. coli wurde in dieser Versuchsreihe nicht mitgeführt.

Abbildung 12: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von L. helveticus in Nährbouillon bei 37°C

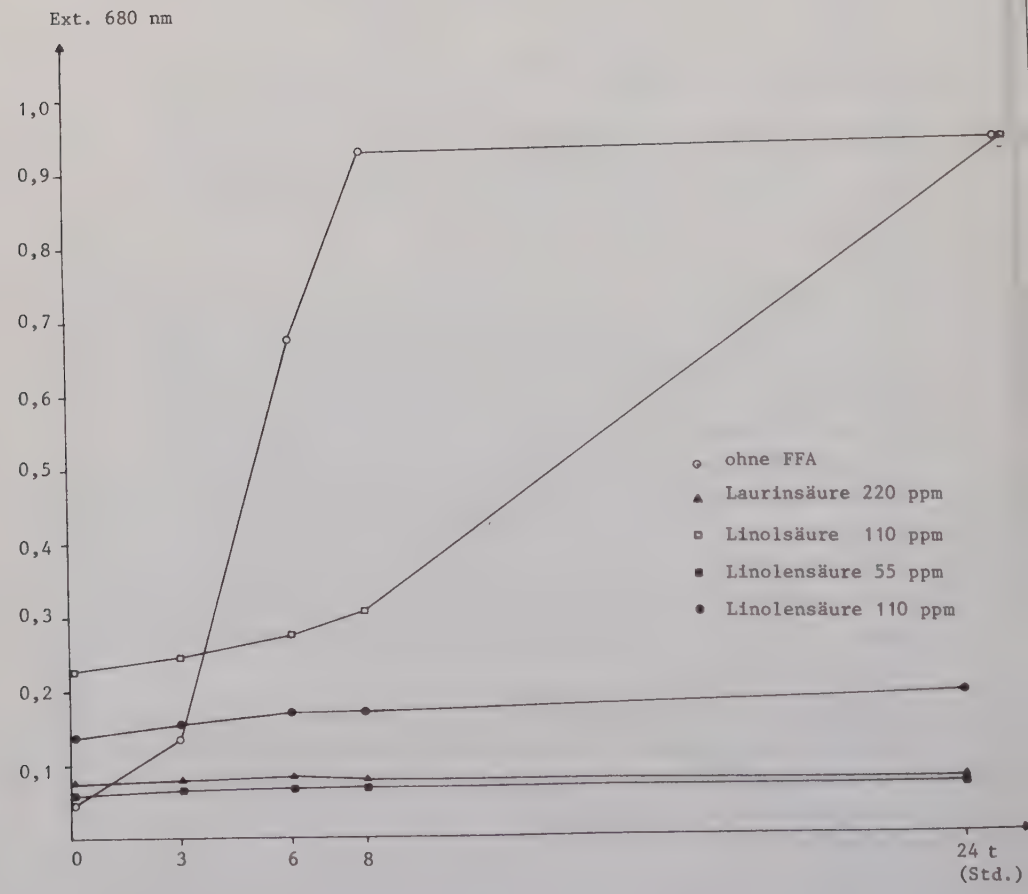


Abbildung 13: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von B. cereus in Nährbouillon bei 30°C

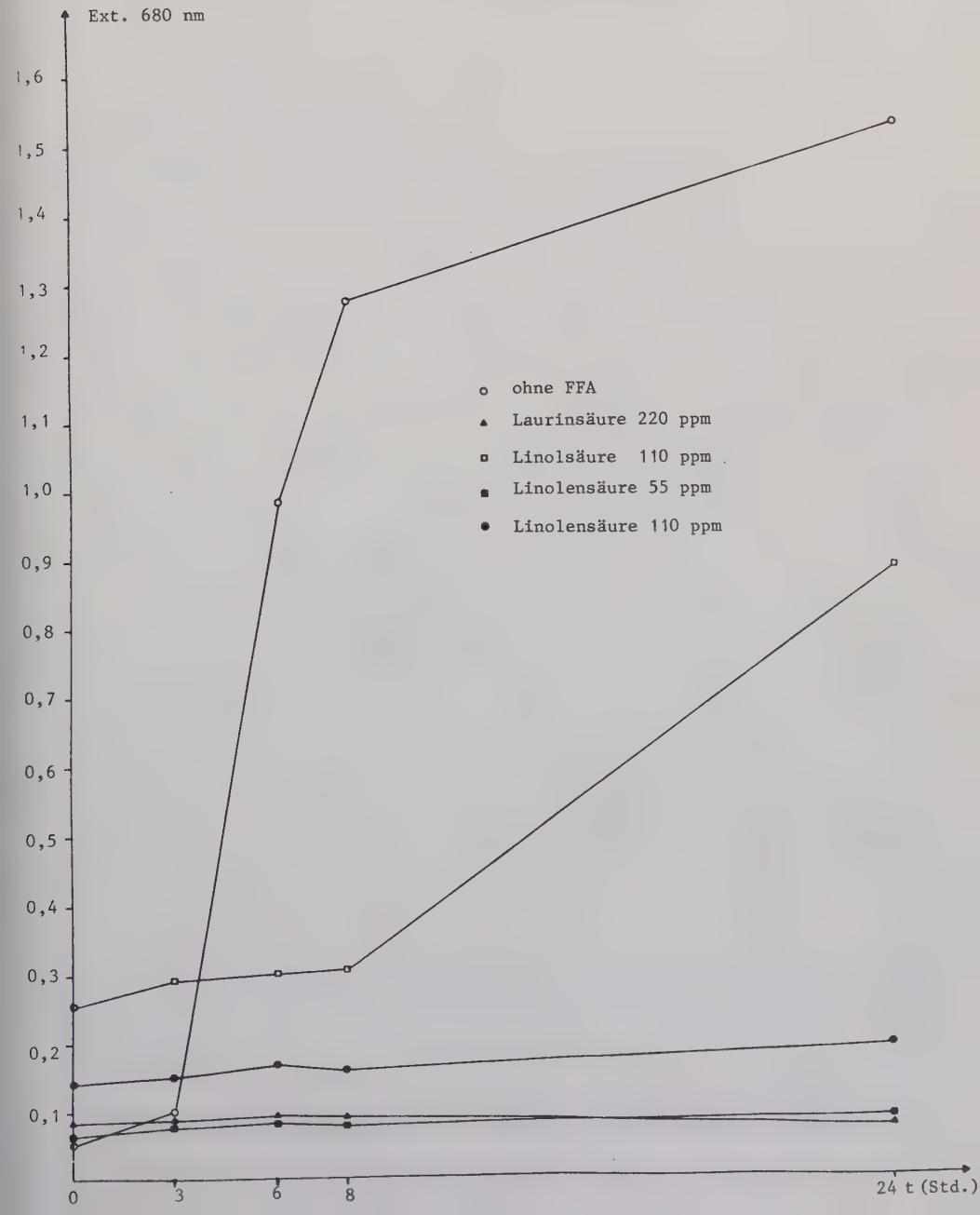


Abbildung 14: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von S. aureus in Nährbouillon bei 37°C

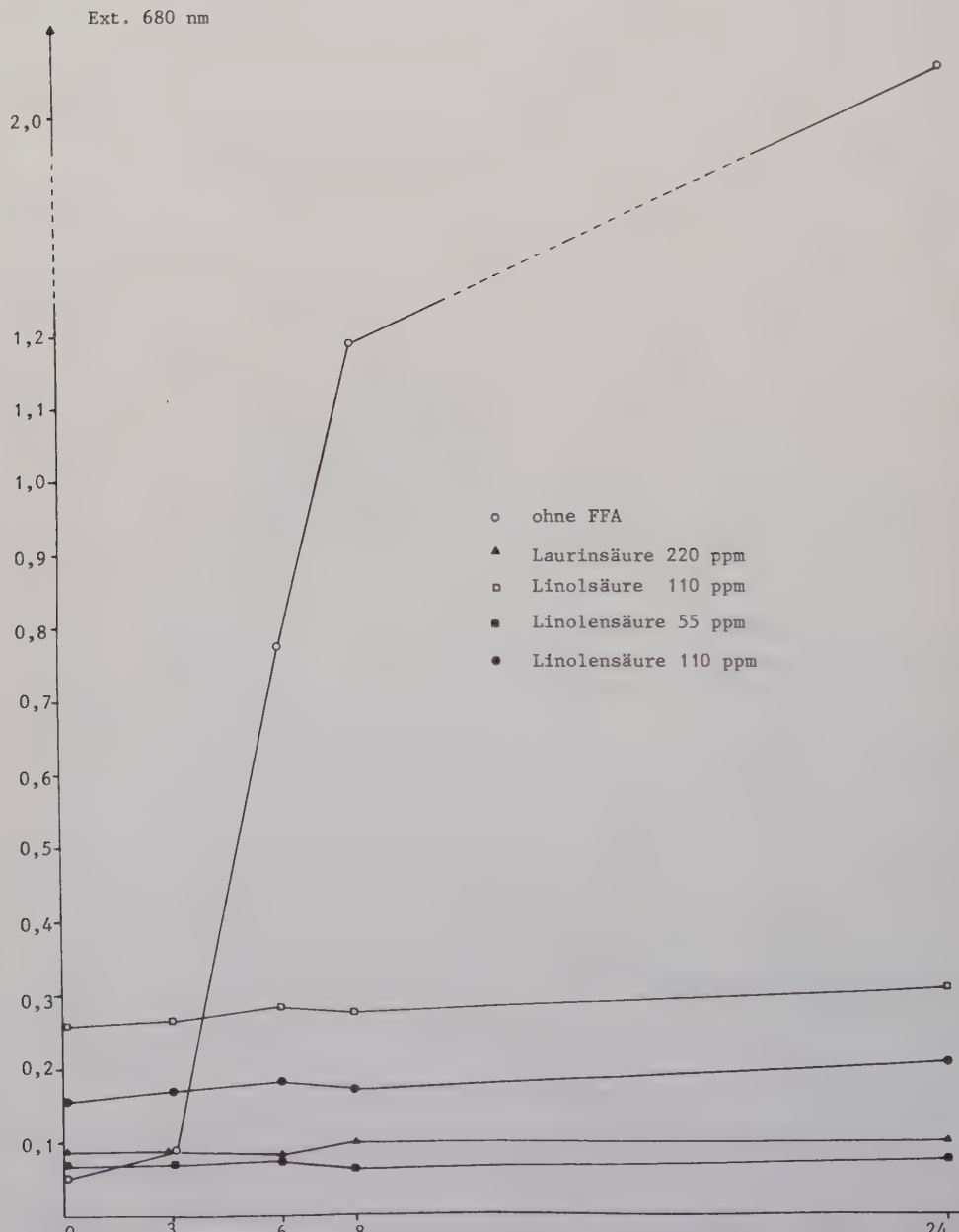


Abbildung 15: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von S. aureus in Nährbouillon bei 37°C

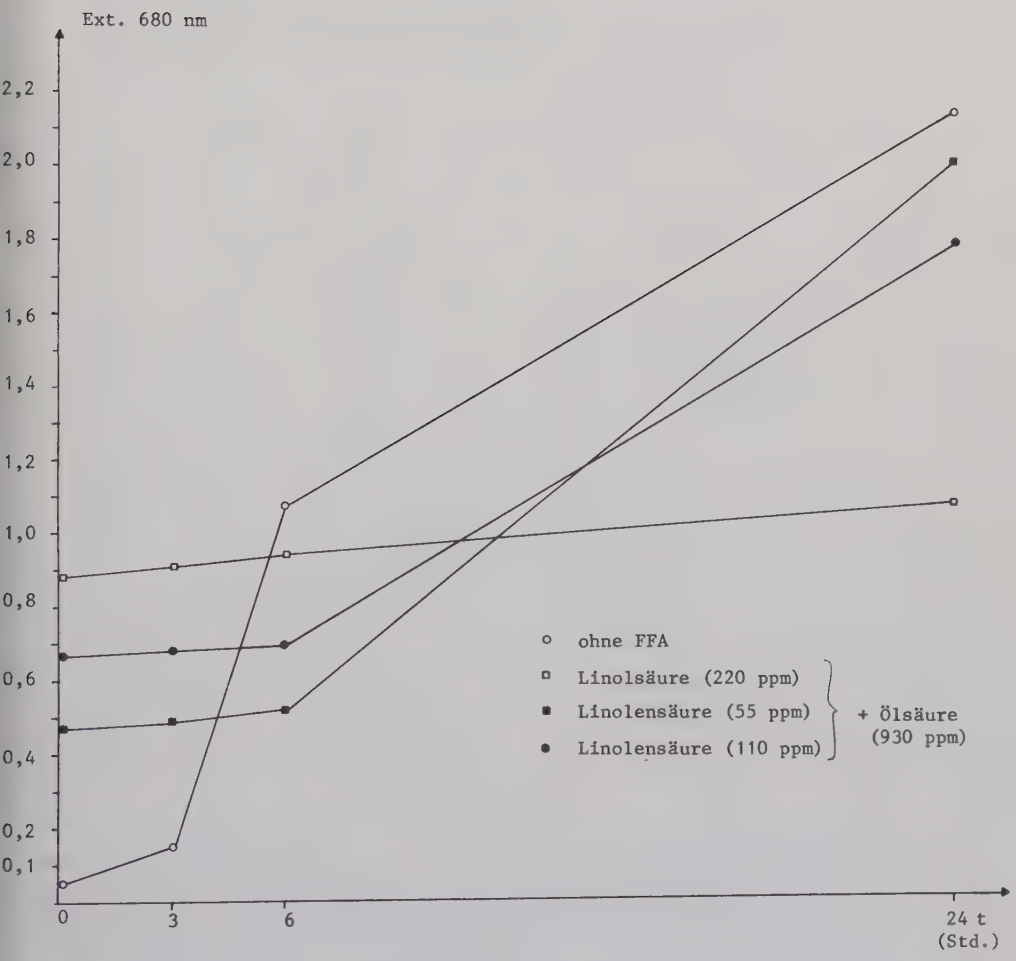
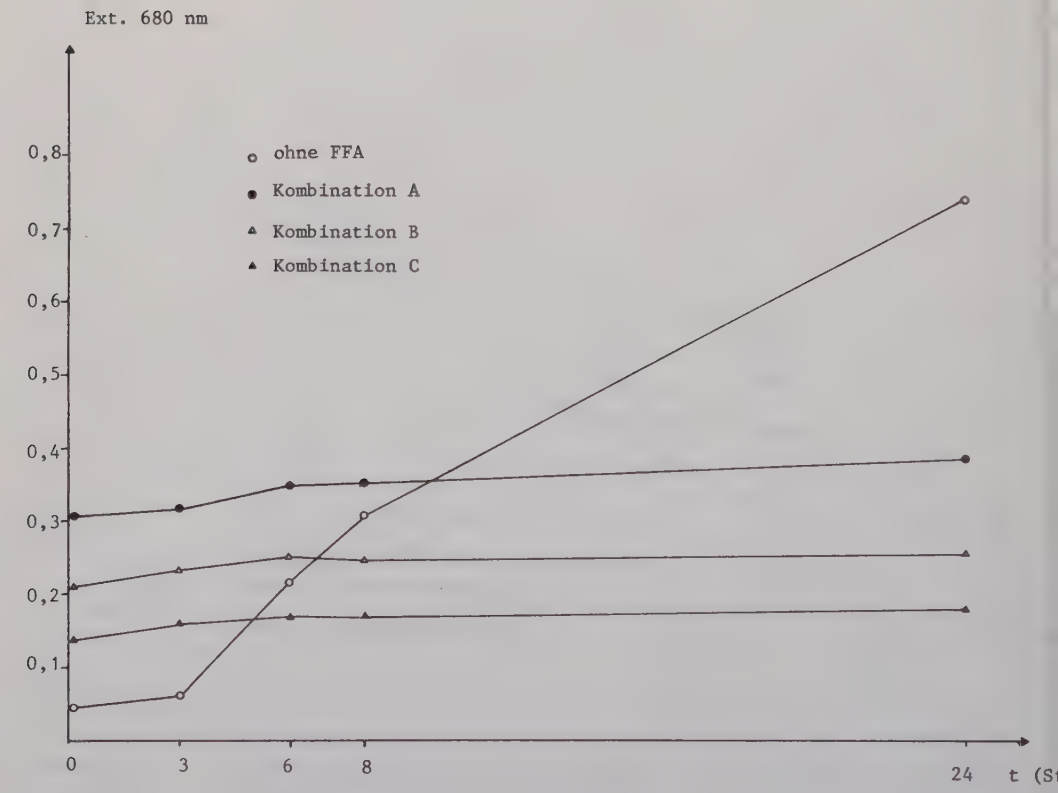


Abbildung 16: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von Sc. lactis in Nährbouillon bei 30°C

FFA-Kombination A: Caprinsäure (48 ppm) + Laurinsäure (55 ppm) + Linolsäure (110 ppm) + Linolensäure (110 ppm)

FFA-Kombination B: Caprinsäure (32 ppm) + Laurinsäure (37 ppm) Linolsäure (73 ppm) + Linolensäure (73 ppm)

FFA-Kombination C: Caprinsäure (24 ppm) + Laurinsäure (27 ppm) Linolsäure (55 ppm) + Linolensäure (55 ppm)



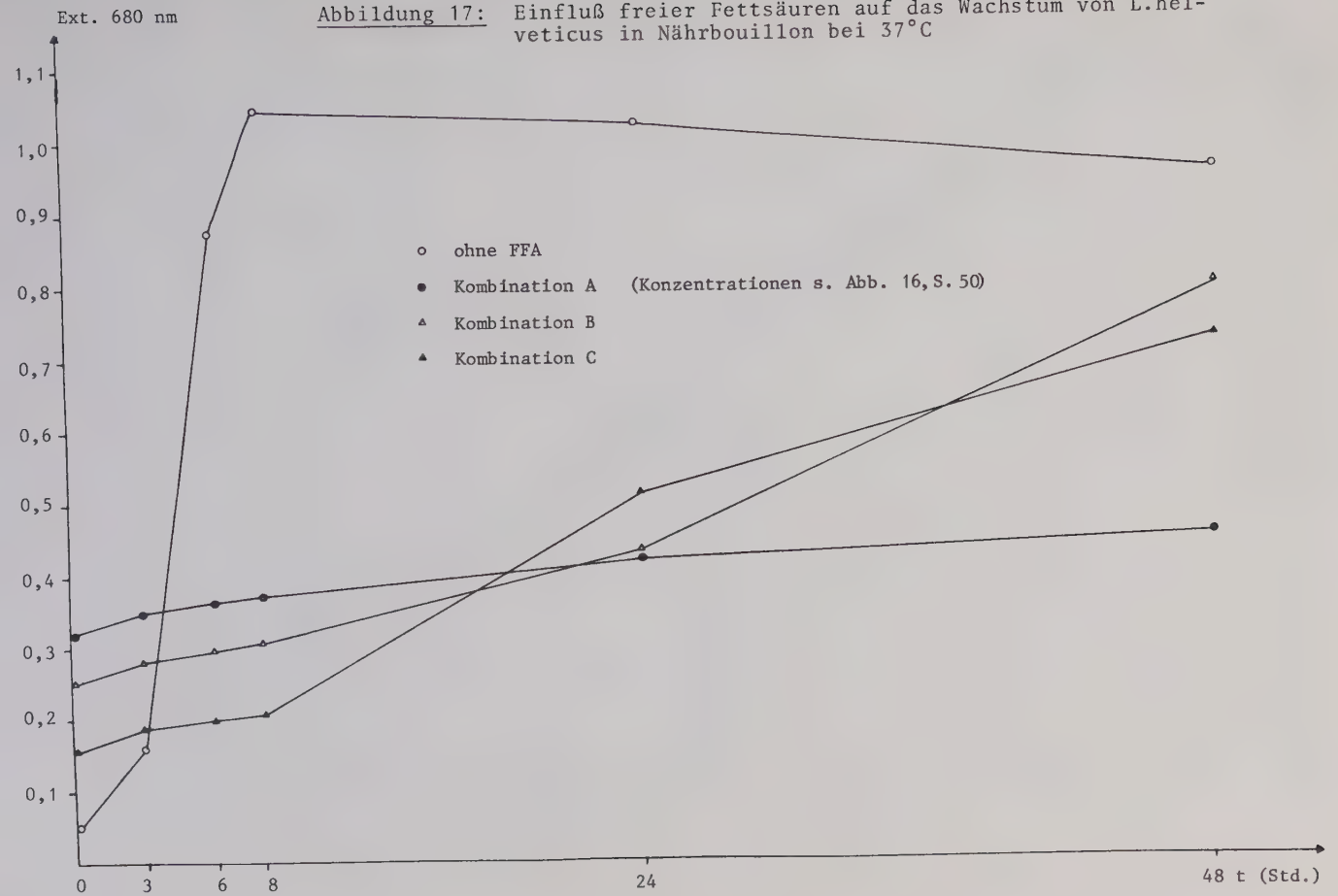



Abbildung 17: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von L.helveticus in Nährbouillon bei 37°C

(Konzentrationen s. Abb. 16, S. 50)

Abbildung 18: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von Pseudomonas sp. in Nährbouillon bei 30°C

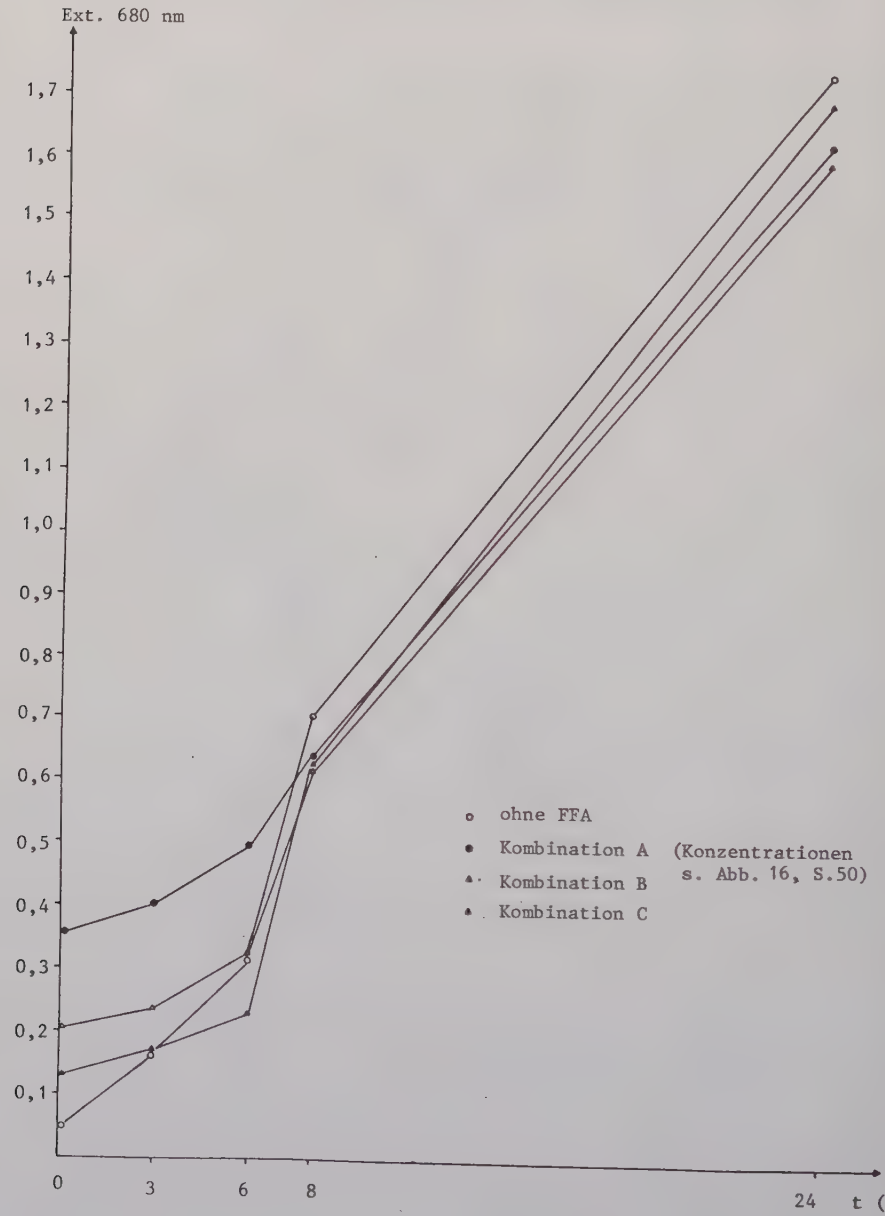


Abbildung 19: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von B.cereus in Nährbouillon bei 37°C

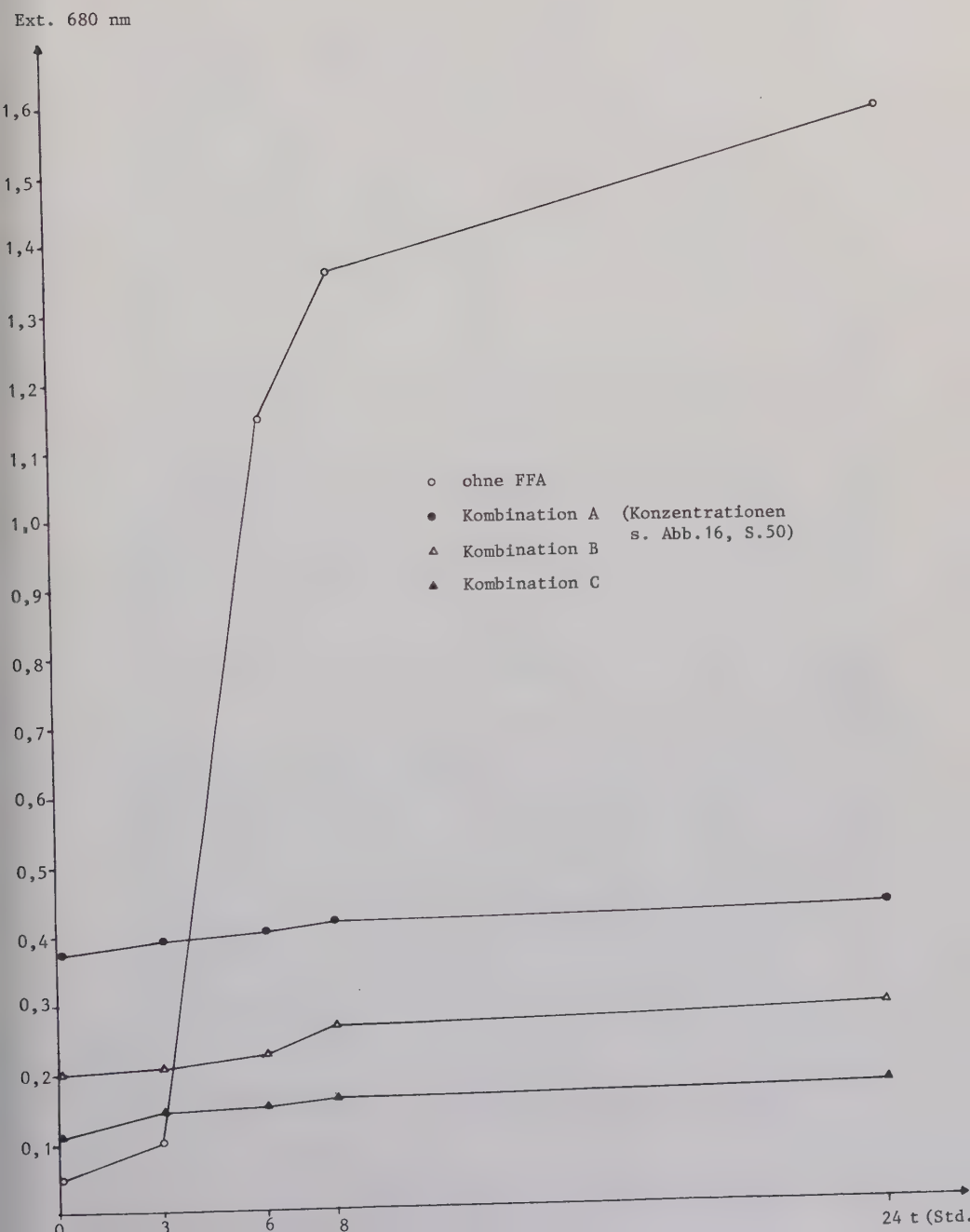
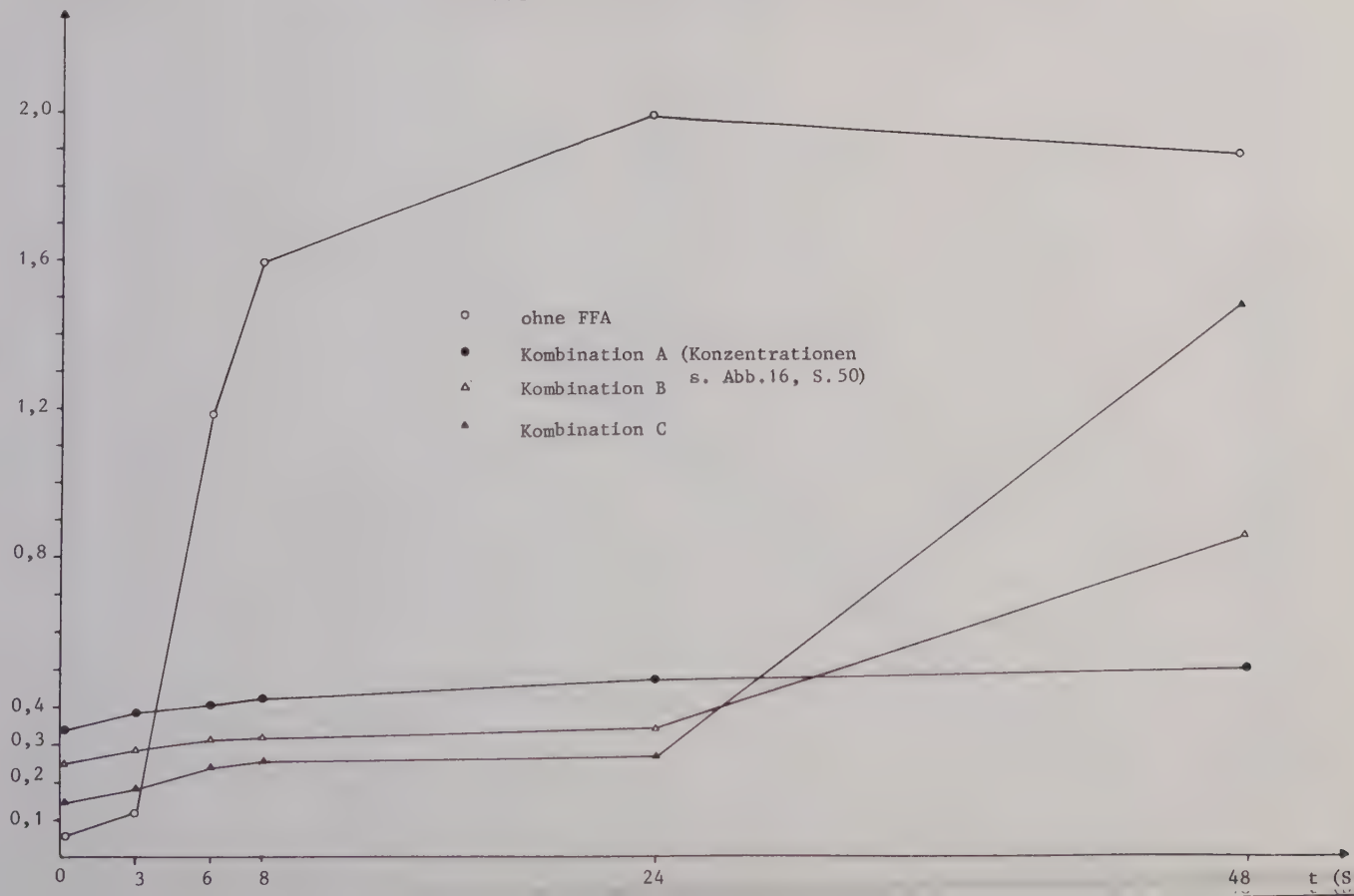


Abbildung 20: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von S.aureus in Nährbouillon bei 37°C



Wie schon in allen bisher beschriebenen Experimenten erwies sich Ps.sp. als unempfindlich gegen die geprüften FFA-Kombinationen, unabhängig von den Konzentrationen der Einzelkomponenten (Abb. 16). Im Gegensatz dazu verhinderten alle Kombinationen das Wachstum von Sc.lactis und B.cereus vollständig (Abb.16 und 19). S. aureus wurde bis zu einer Bebrütungsdauer von 24 Std. sehr stark gehemmt. Nach 48 Std. konnte dagegen bei zwei FFA-Kombinationen Wachstum, wenn auch gegenüber dem Kontrollansatz vermindert, registriert werden (Abb. 20). Ähnlich, allerdings mit etwas weniger steilen Anstiegen der Extinktionen, verhielt sich auch L.helveticus (Abb. 17).

### 3.3.1.3 Wirkung von freien Fettsäuren auf hitzegestreßten B.cereus

Bei der Prüfung des Einflusses von Caprinsäure (97 ppm), Laurinsäure (110 ppm) und Linolsäure (220 ppm) auf hitzegestreßte vegetative Formen von B.cereus konnten keine Unterschiede zum Verhalten dieser FFA gegenüber vitalen Kulturen registriert werden.

### 3.3.1.4 Wirkung von freien Fettsäuren auf C.tyrobutyricum

Bei den Ansätzen mit Ethanol (0,5 % Endkonzentration) sowie Caprinsäure (97 ppm) konnte nach 48 Std./37°C gegenüber dem Kontrollansatz ohne FFA und Lösungsvermittler keine Hemmwirkung beobachtet werden. Eine Erhöhung der Caprinsäurekonzentration auf 388 ppm erniedrigte den Titer von durchschnittlich $10^7$ im Kontrollansatz um 2 bis 3 Zehnerpotenzen. Den gleichen Effekt hatten Laurinsäure (110 ppm) und Linolensäure (220 ppm).

### 3.3.2 Untersuchungen zur Wirkung freier Fettsäuren auf Bakterien in festen Kulturmedien

#### 3.3.2.1 Messung der Wirkung über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Wie aus Tab. 6 hervorgeht, hatte keine der in dieser Versuchsreihe getesteten FFA einen wachstumsmindernden Einfluß auf P.vulgaris. S.aureus und Sc.lactis wurden durch Caprinsäure ebenfalls nicht gehemmt.

Tabelle 6: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von Sc.lactis, P.vulgaris und S.aureus in Nähragar

| Fettsäuren[3] (Konzentrationen) | Testkeime Sc.lactis[2] (KbE/ml) | P.vulgaris[1] (KbE/ml) | S.aureus[1] (KbE/ml) |
|---|---|---|---|
| Kontrollansatz (ohne FFA und Lösungsvermittler) | $4.7 \times 10^8$ | $8.6 \times 10^8$ | $2.7 \times 10^8$ |
| Laurinsäure (110 ppm) | kein Wachstum | $2.2 \times 10^8$ | kein Wachstum |
| Laurinsäure (110 ppm) + Ölsäure (930 ppm) | $5.9 \times 10^6$ | $6.4 \times 10^8$ | $1.6 \times 10^8$ |
| Caprinsäure (97 ppm) | $2.4 \times 10^8$ | $8.2 \times 10^8$ | $1.6 \times 10^8$ |

1 Bebrütung 48 Std./37°C

2 Bebrütung 48 Std./30°C

3 Lösungsvermittler: Triton X-100, 0,1%ig

Laurinsäure (110 ppm) unterdrückte das Wachstum von S. aureus und Sc. lactis, ein Effekt, der durch Zugabe von Ölsäure (930 ppm) für S. aureus völlig, für S. lactis zum Teil eliminiert wurde.

Der Einfluß verschiedener FFA-Kombinationen auf die Vermehrung von Sc. lactis, E. coli, P. vulgaris und S. aureus ist in Tab. 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von Sc. lactis, E. coli, P. vulgaris und S. aureus in Plate-Count-Agar

| Fettsäuren[3)4)] (Kombinationen) | Testkeime | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Sc. lactis[2)] (KbE/ml) | E. coli[1)] (KbE/ml) | P. vulgaris[1)] (KbE/ml) | S. aureus[1)] (KbE/ml) |
| Kontrollansatz (ohne FFA und Lösungsvermittler) | $3.2 \times 10^8$ | $1.2 \times 10^9$ | $9.6 \times 10^8$ | $3.7 \times 10^8$ |
| 0,1 % Triton X-100 | $3.8 \times 10^7$ | nicht getestet | $10.8 \times 10^8$ | $3.4 \times 10^8$ |
| Kombination a | $1.0 \times 10^7$ | $1.2 \times 10^9$ | $8.4 \times 10^8$ | $2.6 \times 10^8$ |
| Kombination b | kein Wachstum | $1.0 \times 10^9$ | $6.4 \times 10^8$ | kein Wachstum |
| Kombination c | kein Wachstum | $1.2 \times 10^9$ | $7.4 \times 10^8$ | kein Wachstum |
| Kombination d | kein Wachstum | $1.1 \times 10^9$ | $8.4 \times 10^8$ | kein Wachstum |

1) Bebrütung 48 Std./37°C
2) Bebrütung 48 Std./30°C
3) FFA-Kombinationen (s. 3.2.2.1, S.30)
4) Lösungsvermittler: Triton X-100, 0,1%ig

Wie schon nach den Ergebnissen der bisherigen Versuche zu erwarten war, tolerierten die gramnegativen Testkeime (E. coli und P.vulgaris) alle FFA-Kombinationen. Sc. lactis zeigte im Gegensatz zu den übrigen Keimen eine leichte Beeinträchtigung durch das Lösungsmittel. Bei relativ geringen FFA-Konzentrationen konnte die Hemmwirkung auf Sc. lactis und S. aureus mit Ölsäure kompensiert werden (Kombination a). Steigende FFA-Gehalte wurden dagegen auch bei Erhöhung des Ölsäureanteils nicht mehr toleriert (Kombination b). Auch die Kombinationen c und d unterdrückten das Wachstum der Grampositiven völlig.

3.3.2.2 Messung der Wirkung mit der ökometrischen Technik

Die Ergebnisse dieser letzten Versuchsreihe bestätigen wiederum die Unempfindlichkeit der geprüften gramnegativen Keime (E. coli und P. vulgaris) gegenüber einzelnen FFA bzw. FFA-Kombinationen (s. 3.2.2.2). Stets wurden sowohl in den Kontrollansätzen als auch in den Ansätzen mit FFA Wachstumsindices von 4,2 erreicht.

Bei den grampositiven Testkeimen (Sc. lactis und S. aureus) interessierten vor allem die Kombinationen mit Ölsäure, durch deren Zusatz, wie unter 3.3.2.1 beschrieben, eine gewisse Kompensation der Hemmwirkung anderer FFA zu beobachten war. So unterdrückte Linolsäure (220 ppm) allein das Wachstum von Sc. lactis und S. aureus vollständig, während in Kombination mit Ölsäure (930 ppm) die maximalen Wachstumsindices (4,2) registriert wurden (s. Tab. 8).

Ebenso wurde die hemmende Wirkung von Caprin- und Laurinsäure auf S. aureus gemildert. Eine Kombination (a) von Ölsäure (930 ppm) mit Caprinsäure (97 ppm), Laurinsäure (110 ppm) und Linolsäure (220 ppm) resultierte in einem Wachstumsindex von 4,2. Bei einer Vervierfachung dieser Konzentrationen (einschließlich der der Ölsäure) war allerdings keine wesentliche Kompensation mehr festzustellen (Kombination b). Kombinationen ohne Ölsäure (c, d) ergaben den Wachstumsindex 0.

Tabelle 8: Einfluß freier Fettsäuren auf das Wachstum von Sc.lactis und S.aureus in Plate-Count-Agar

| Fettsäuren[4)5)] (Konzentrationen in ppm) | Wachstumsindex[3)] Sc.lactis[1)] | S.aureus[2)] |
|---|---|---|
| Kontrollansatz (ohne FFA und Triton X-100) | 4,2 | 4,2 |
| Triton X-100 (0,1%ig) Ethanol (0,5%ig) für Sc.lactis | 4,2 | 4,2 |
| Caprinsäure (388) | n.d. | 0 |
| Laurinsäure (440) | n.d. | 0 |
| Ölsäure (930) | 4,2 | 4,2 |
| Linolsäure (220) | 0 | 0 |
| Caprinsäure (194 + Ölsäure (930) | 4,0 | 3,8 |
| Laurinsäure (220) + Ölsäure (930) | 0,4 | 2,0 |
| Linolsäure (220) + Ölsäure (930) | 4,2 | 4,2 |
| Kombination a | n.d. | 4,2 |
| Kombination b | n.d. | 0,2 |
| Kombination c | n.d. | 0 |
| Kombination d | n.d. | 0 |

1) Bebrütung 48 Std./30°C
2) Bebrütung 48 Std./37°C
3) Mittelwerte aus 3 Ansätzen;
4) Lösungsvermittler Triton X-100 (0,1%ig) bzw. Ethanol
5) Kombinationen: s. 3.2.2.1, S. 30

n.d.: nicht durchgeführt

## 4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob und wie stark verschiedene FFA das Wachstum einiger teils nützlicher, teils schädlicher milchwirtschaftlich relevanter Bakterien beeinflussen. In der Literatur wird über den Einfluß von insbesondere geradzahligen FFA vor allem auf die Vermehrung von Starterkulturen und daneben von einigen Verderbniserregern und pathogenen Keimen berichtet. In dieser Arbeit wurden folgende Gram-negative und Gram-positive Keime in die Versuche einbezogen: E. coli, Pseudomonas (Ps.) sp., P. vulgaris, S. aureus, Sc. lactis, L. helveticus, B. cereus und C. tyrobutyricum. Damit wurden sowohl Repräsentanten von Starterkulturen als auch von den Verderbniserregern und potentiell pathogenen Keimen berücksichtigt. Es wurden diejenigen FFA für die Versuche ausgewählt, die in Milch und Milchprodukten relativ am stärksten vertreten sind. Die dabei verwendeten Konzentrationen orientierten sich an Angaben von THAKUR et al. (1974) über FFA-Gehalte in Käse. Um die Modelle über die Wirkung der FFA auf die ausgewählten Keime nicht einseitig zu halten, wurden flüssige und feste Medien verwendet. Die Auswertung des Keimwachstums erfolgte bei ersteren mit dem Koch'schen Gußplattenverfahren, der Nephelometrie oder einem Titerverfahren, bei letzteren mit dem Koch'schen Gußplattenverfahren und der ökometrischen Technik nach MOSSEL et al. (1980). Es kam bei diesem Versuchen auch darauf an, die Eignung der Modelle im Hinblick auf eine Beeinträchtigung der Fettsäuren durch den Versuchsansatz, z.B. Autoklavieren, zu testen.

Die Untersuchungsergebnisse haben grundsätzlich gezeigt, daß Gram-negative Bakterien gegenüber FFA im geprüften Konzentrationsbereich bedeutend widerstandsfähiger sind als Gram-positive. Auch bei Verwendung von FFA-Kombinationen konnte das Wachstum der Gram-negative nicht beeinflußt werden. Ähnlich stellten KODICEK und WORDEN (1945), KULSHRESTHA und MARTH (1970), KABARA et al. (1972), GALBRAITH und MIL-

LER (1971, 1973a) sowie FAY und FARIAS (1976) bei ihren Untersuchungen fest, daß Gram-negative Keime gegen die antibakterielle Aktivität von FFA resistent oder, im Vergleich zu Gram-positiven Keimen, weniger empfindlich sind.

HAMILTON (1970) erklärt die Resistenz der Gram-negativen Bakterien mit der robusten Zellwand, die eine Wirkung antibakterieller Substanzen auf die tieferliegende empfindliche Zellmembran verhindert. Bei den Gram-positiven spielt nach Angaben von WOODROFFE und WILKINSON (1966) die unterschiedliche Membranzusammensetzung eine Rolle bei der Empfindlichkeit der Zellen gegen freie Fettsäuren. Das wäre eine Erklärung, warum die verschiedenen Bakterien (z.B. B.megaterium und M.lysodeikticus) gegenüber FFA unterschiedliche Empfindlichkeit zeigen (GALBRAITH und MILLER 1973a).

Von allen getesteten Mikroorganismen zeigte B.cereus die größte Empfindlichkeit gegenüber FFA. Mit Ausnahme von Caprinsäure hemmen die in der Arbeit eingesetzten FFA und Kombinationen davon das Wachstum von B.cereus sehr stark. Über diese Empfindlichkeit von B.cereus wurde auch von PODESTA und BERTOLDINI (1967) berichtet.

Sc. lactis, L.helveticus und S.aureus zeigten nach 24stündiger Bebrütung gegenüber einzelnen FFA und deren Kombinationen fast gleiche Empfindlichkeiten. Bei Verlängerung der Bebrütungszeit bis 48 Std. ist eine Vermehrung von L.helveticus und S.aureus bei Kombinationen B und C (Abb. 17 und 20) zu beobachten. C.tyrobutyricum erwies sich als etwas weniger empfindlich als die vorher genannten Keime.

Unter allen eingesetzten FFA hatte Caprinsäure in einfacher Konzentration (97 ppm) nach Ölsäure die geringste Hemmwirkung auf die Gram-positiven Bakterien ausgeübt. Caprinsäure (97 ppm) wirkte nicht wachstumshemmend auf Sc.lactis und L. helveticus (Abb. 6 u.7) und zeigte einen sehr geringen Einfluß auf die Vermehrung von S.aureus (Abb. 11). Wie bereits erwähnt, war auf B.cereus zunächst keine Wirkung festzustel-

len. Nach einer Bebrütungszeit von ca. 12 Stunden wurde im Gegensatz zur Kontrolle keine weitere Vermehrungbeobachtet (Abb.10). Ähnliche mit der Zeit zunehmende Hemmwirkung von Caprinsäure berichteten KULSHRESTHA und MARTH (1974d) auf das Wachstum von Sc.thermophilus, wobei eine 90%ige Hemmung erst nach 14 Stunden festzustellen war. In den eigenen Versuchen war außerdem zu beobachten, daß die Trübung der Bouillonkultur unter Einfluß von Caprinsäure nach 24 Std. deutlich abnahm. Dies kann mit einer Beschleunigung der Sporulation erklärt werden, wodurch die größeren Zellen durch kleinere Sporen ersetzt werden und eine optische Dichte bewirkt wird. Bei einer erhöhten Konzentration (388 ppm) hemmte Caprinsäure das Wachstum von S.aureus total, von C. tyrobutyricum ziemlich stark. In der Literatur wurde berichtet, daß bei 500 und 1000 ppm totale (COSTILOW und SPECK, 1951; MAXCY und CHANDAN, 1962; KULSHRESTHA und MARTH, 1970) und bei 100 ppm teilweise (MAXCY und CHANDAN, 1962; KULSHRESTHA und MARTH, 1970) wachstumshemmende Wirkung von Caprinsäure zu beobachten ist. Nach Angaben von VADEHRA und HARMON (1965), KULSHRESTHA und MARTH (1970, 1974b), HECZKO et al. (1979) zeigte Caprinsäure bis 100 ppm auf das Wachstum von S.aureus keine Hemmwirkung, während dieser Keim bei 500 - 1000 ppm gegenüber gleichen Säuren sehr stark empfindlich ist. HECZKO et al. (1979) stellten sogar bei 0,78 mmol (ca. 135 ppm) eine bedeutende und bei 1,56 mmol (ca.270 ppm) eine sehr starke Wirkung fest.

Laurinsäure (220 ppm) hemmte die Vermehrung Gram-positiver Bakterien völlig. Bei 110 ppm übte sie auf Sc.lactis, L. helveticus und C.tyrobutyricum eine relativ starke und auf B.cereus eine total wachstumshemmende Wirkung aus, während S.aureus nach 24 Stunden eine große Empfindlichkeit zeigte, die bei 48stündiger Bebrütungszeit wesentlich aufgehoben wurde. Über eine ähnliche vorübergehende Hemmwirkung berichteten KULSHRESTHA und MARTH (1974a) bei Testung von Caprinsäure (100 ppm) auf die Vermehrung von E.coli. Dabei war die

Hemmung nur bis zu 14 Stunden zu beobachten. Eine leichte und temporäre Hemmwirkung von Laurinsäure auf das Wachstum von Sc.lactis (COSTILOW und SPECK, 1951) und von S.aureus (VADEHRA und HARMON, 1965) wurde nur in höheren als den hier verwendeten Konzentrationen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu fanden HECZKO et al. (1979) eine große Empfindlichkeit von S.aureus gegenüber Laurinsäure schon bei 0,39 mmol (ca. 78 ppm).

Myristin- (520 ppm), Palmitin- (1060 ppm) und Stearinsäure (420 ppm) blieben unwirksam auf das Wachstum von E.coli und S.aureus. (Andere Keime wurden nicht getestet). Die Unwirksamkeit der letztgenannten langkettigen gesättigten FFA wurde auch im Schrifttum auf die Vermehrung von Sc.lactis (COSTILOW und SPECK, 1951), S.aureus (VADEHRA und HARMON, 1965) und E.coli (PODESTA und BERTOLDINI, 1967) beschrieben.

Von den ungesättigten FFA zeigte Ölsäure (930 ppm) keine Hemmwirkung auf alle getesteten Mikroorganismen. Dagegen verhinderten die beiden anderen ungesättigten FFA, Linol- und Linolensäure (220 ppm) das Wachstum von Sc.lactis, B. cereus und S.aureus total und von C.tyrobutyricum wesentlich. L.helveticus zeigte in Gegenwart von Linolensäure eine starke, von Linolsäure eine leichte Empfindlichkeit. Viele Autoren wiesen auch nach, daß Ölsäure in höheren Konzentrationen auf die Vermehrung von verschiedenen Bakterien keinen Einfluß hatte (KODICEK und WORDEN, 1945; COSTILOW und SPECK, 1951; VADEHRA und HARMON, 1965; POZANSKI et al. 1968; CAMPBELL et al., 1983). Es wurde berichtet, daß Linol- und Linolensäure (1000 ppm) das Wachstum von Sc.lactis (COSTILOW und SPECK, 1952) und Gram-negativen Keimen (KODICEK und WORDEN, 1945) nicht beeinflussen, während BROOME et al. (1979) bei Streptokokken gegenüber Linolsäure unterschiedliche Empfindlichkeit fanden. Aus neueren Angaben geht hervor, daß Linolsäure 3,2 mmol (ca. 896 ppm) und 0,6 mmol (ca. 168 ppm) und Linolensäure 0,19 mmol (ca. 54 ppm) auf S.aureus wachstumshemmenden Einfluß haben (HECZKO et al., 1979; CAMP-

BELL et al., 1983). KODICEK und WORDEN (1944) erwähnten, daß die letztgenannten ungesättigten FFA schon in sehr niedriger Konzentration auf die Vermehrung von S. aureus und L. helveticus Hemmung ausübten.

In den eigenen Untersuchungen wurde beobachtet, daß die Hemmwirkung von Laurin- (110 ppm), Linol- (220 ppm) und Linolensäure (110-55 ppm) auf Bakterien durch Zugabe von Ölsäure (930 ppm) völlig oder teilweise aufgehoben wurde (Abb. 15 und Tab. 6 und 8). Zu ähnlichen Resultaten waren CAMPBELL et al. (1983) gekommen, die feststellten, daß die Hemmwirkung von Linolsäure auf S. aureus in Kombinationen mit Ölsäure gemindert wurde. Dies soll darauf zurückzuführen sein, daß die Schleimbildung der Kapsel gefördert und Ölsäure sogar eingebaut wird. Wieweit ein gleicher oder ähnlicher Mechanismus auch für die protektive Wirkung der Ölsäure gegenüber der Einwirkung von Laurin- und Linolsäure auf Sc. lactis gilt, läßt sich aus den eigenen Untersuchungen nicht sagen. Die vorher genannten Autoren deuten auch noch an, daß die Ölsäure mit Peptidoglykonketten von S. aureus einen Komplex bilden kann, wodurch die normale Zellwandbildung gestört und Schleimbildung gefördert wird. Durch die Ölsäure bedingte Strukturänderungen in der Zellwand könnten eventuell auch bei anderen Keimen eine Erklärung für die Aufhebung der antimikrobiellen Wirkung der genannten ungesättigten Fettsäuren sein.

FFA mit längeren Ketten zeigen Hemmwirkung in der Reihenfolge: $C_8 < C_{10} < C_{12} \geq C_{14} > C_{16} \geq C_{18}$. Der antibakterielle Effekt der $C_{18}$-Fettsäuren bezogen auf Sättigung und isomere Form verhält sich wie folgt: $C_{18:0} < C_{18:0}$ (trans) $< C_{18:1}$ (cis) $< C_{18:2} \leq C_{18:3}$ (GALBRAITH et al., 1971). Die Feststellung von NETTER (1969), daß die Linol- und Linolensäure aufgrund der Doppelbindungen noch aktiver als Ölsäure und andere ungesättigte FFA sind, steht in Einklang mit den eigenen Ergebnissen.

Für die Wirkungsweise der FFA auf Bakterien werden unterschiedliche Eigenschaften und Mechanismen verantwortlich gemacht, ins-

besondere Struktur und Konzentration der FFA in Verbindung mit den dadurch bedingten physikalisch-chemischen Eigenschaften.
Voraussetzung für ein Einwirken der FFA ist deren Löslichkeit im Medium einerseits und andererseits ihre Affinität gegenüber den Bakterienzellen.

Die hydrophile Eigenschaft ist maßgeblich für die Löslichkeit der FFA im wäßrigen Medium (BEAN, 1967; GALBRAITH und MILLER, 1973a), die hydrophobe Eigenschaft für die Anheftung an die Bakterienzelle (VADEHRA und HARMON, 1965; GALBRAITH und MILLER, 1973a). Die hydrophile Eigenschaft bzw. die Löslichkeit der FFA hängt ab von deren Grad der Ionisation (SPINK, 1963; BAGG, HABER und GREGOR, 1966). Bei saurem pH liegen FFA in stärkerem Maße undissoziiert vor, wodurch sich ihre Wasserlöslichkeit vermindert, jedoch ihre Affinität gegenüber der Bakterienzelle aufgrund des lipophileren Charakters dieses Zustandes steigert. Alkalisches pH ermöglicht den stärker lipophilen langkettigen FFA die für ihre Wirkung notwendige Löslichkeit im wäßrigen Medium (GALBRAITH und MILLER, 1973a).

Die Löslichkeit der FFA im wäßrigen Milieu und in den Lipidstrukturen der Bakterienzellwand bzw. Zytoplasmamembran bedingt eine Reduzierung der Grenzflächenspannung zwischen Zellwand bzw. Zytoplasmamembran einerseits und Medium andererseits (GALBRAITH und MILLER, 1973b). Infolge von Veränderungen der Zytoplasmamembran kommt es zu verstärktem Austreten von Proteinen und Peptiden aus der Zelle und zur Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zelle (HOTCHKISS, 1946; SALTON, 1951; HAMILTON, 1970; HUGO und BLOOMFIELD, 1971; GALBRAITH und MILLER, 1973b). Eine Desintegration der Zytoplasmamembran bedingt irreversible Störungen der Zellatmung. Eine Änderung der Membranpermeabilität für Protonen hat die reversible Hemmung des aktiven Transportes von Aminosäuren und Protonen zur Folge (GALBRAITH und MILLER, 1973c).

Die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Bakterienstämme bzw. Spezies ist zum Teil auf uneinheitliche Zerreißfestigkeit der Zytoplasmamembran, die als eigentlicher Wirkungsort der FFA angesehen wird, zurückzuführen (GALBRAITH und MILLER, 1973b). Die Resistenz gramnegativer Keime gegenüber FFA wird der besonderen Zellwandstruktur dieser Keime zugeschrieben (HAMILTON, 1970).

Für die Modellversuche war es wichtig zu wissen, ob die Fettsäuren durch die Sterilisation des Nährbodens nicht verändert werden, auch wenn nach Angaben von verschiedenen Autoren ein Autoklavieren der FFA nicht unbedingt erforderlich (SHEU und FREESE, 1972; HECZKO et al., 1979; MACASKIE, 1982) ist. In dieser Arbeit wurde daher in einigen orientierenden Ansätzen untersucht, ob bei durch die Luft- und Hitzeeinwirkung beim Autoklavieren autooxidative Vorgänge induziert werden. Zu diesem Zweck wurde die Jodzahl von Ölsäure (nach KAUFMANN, 1969) und Peroxidzahl (nach WHEELER, 1969) von Caprin-, Laurin-, Öl-, Linolsäure vor und nach dem Autoklavieren bestimmt. Die Ergebnisse ließen folgendes erkennen: Nach dem Autoklavieren hat die Ölsäure immer niedrigere Jodzahlen, d.h. daß die Ölsäure durch Hitzeeinwirkung teilweise verändert wird. Bei der Peroxidzahlbestimmung wiesen Öl- und Linolsäure steigende Werte auf. Die erhöhten Peroxidzahlen für Öl- und Linolsäure zeigten oxidative Veränderungen bei den ungesättigten Fettsäuren an, während die gesättigte Caprin- und Laurinsäure mit der Peroxidzahl 0 keine Beeinträchtigung erkennen ließen. Diese veränderten Werte aus zusätzlichen Modellversuchen deuten zwar an, daß FFA durch Hitzebehandlung eine Veränderung erfahren; um jedoch etwas über die Änderung der antibakteriellen Wirkung zu erfahren, mußten auch entsprechend mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Nach den Ergebnissen ist festzustellen, daß die Einflüsse von Caprin-, Öl- und Linolsäure auf die Vermehrung von Sc.lactis und S.aureus nach dem Autoklavieren gleich blieben.

Unter den Methoden, die in der Arbeit zur Auswertung der Versuchsansätze verwendet wurden, hatte das optische (nephelometrische) Verfahren vor allem den Vorteil, daß das Wachstum der Bakterien während der Bebrütung ohne größeren Aufwand kontrolliert und schon während des Versuchs Wachstumskurven für Bakterien aufgezeichnet werden konnten. Das Koch'sche Gußplattenverfahren ist sehr zeit- und materialaufwendig im Vergleich zum optischen und ökometrischen Verfahren. Die Ergebnisse, die mit den drei Methoden erhalten wurden, zeigten relativ gute Übereinstimmung.

Hinsichtlich der Untersuchungstechnik lassen die Erfahrungen dieser Arbeit folgende Empfehlungen zu:

a) FFA von möglichst hohem Reinheitsgrad (99,9%) müssen gegen mögliche Oxidation, bei -18°C in dunklen und gut verschlossenen Gefäßen aufbewahrt werden.

b) Um eine bestmögliche Löslichkeit oder Verteilung der FFA zu haben, sollte die Temperatur der Nährbouillon von ca. 30-37°C bei Zugabe etwa 1 Std. beibehalten werden, weil sich die FFA bei niedrigeren Temperaturen schwerer lösen lassen.

c) Um eine homogene Verteilung zu erzielen, müssen die Proben mit FFS im Schüttelbrutschrank (bei 200 upm) geschüttelt werden.

d) Die Testkeime sollen nach etwa 18- bis 20stündiger Bebrütung noch in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befindlich benutzt werden.

## 5. Zusammenfassung

Mit verschiedenen Untersuchungsmethoden (konventionelles Keimzählungsverfahren, Ökometrie, optisches Verfahren, Titerbestimmung) sollte der Einfluß freier Fettsäuren (FFA) in festen und flüssigen Labormedien auf milchwirtschaftlich relevante Mikroorganismen geprüft werden. Als Testkeime dienten Streptococcus lactis, Lactobacillus helveticus, Escherichia coli, Clostridium tyrobutyricum, Proteus vulgaris, Pseudomonas sp., Bacillus cereus und Staphylococcus aureus. An FFA wurden eingesetzt: Caprin-, Laurin-, Myristin-, Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol- und Linolensäure jeweils allein und in Kombination. Die Konzentrationen orientierten sich an Werten, wie sie für Cheddar im Schrifttum angegeben werden (etwa 100 ppm und Vielfache hiervon).

Sämtliche Gram-negativen Testkeime (E. coli, P. vulgaris, Pseudomonas) erwiesen sich, unabhängig von der Versuchsordnung und den FFA bzw. ihren Kombinationen und Konzentrationen, als unempfindlich. Bei den Gram-positiven Testkeimen ergaben sich hinsichtlich der Sensibilität deutliche, speziesabhängige Unterschiede. So erwies sich B. cereus als am stärksten und C. tyrobutyricum als am wenigsten empfindlich. Sc.lactis, L. helveticus und S.aureus verhielten sich relativ ähnlich.

Myristin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure hatten auch in höheren Konzentrationen wenig Einfluß auf die Vermehrung der Mikroorganismen. Caprin-, Laurin-, Linol- und Linolensäure wirkten dagegen je nach Testkeim hemmend bis zur völligen Unterdrückung jeden Wachstums. Kombinationen von FFA waren i.d.R. effektiver als die Einzelkomponenten. Die Hemmungswirkung von Laurin-, Linol- und Linolensäure konnte konzentrationsabhängig durch Zusatz von Ölsäure gemildert werden.

Da Untersuchungen im Schrifttum vorliegen, bei denen der Zusatz der FFA zu den Medien vor dem Autoklavieren erfolgte, sollte in einigen orientierenden Versuchen der Einfluß auf die keimhemmende Wirkung der FFA geprüft werden. Obwohl oxidative Veränderung an verschiedenen FFA festgestellt werden konnten, resultierten hieraus keine Unterschiede zu den Ergebnissen, die mit den entsprechenden nicht autoklavierten Säuren erzielt wurden.

SUMMARY

In vitro effects of free fatty acids on some bacteria important for the dairy industry.

The influence of free fatty acids (FFA) in solid and liquid laboratory media on microorganisms relevant in the dairy industry was investigated with different methods (conventional pour-plate-method, ecometry, optical methods and titre determination). The test organisms were Streptococcus lactis, Lactobacillus helveticus, Escherichia coli, Clostridium tyrobutyricum, Proteus vulgaris, Pseudomonas sp., Bacillus cereus and Staphylococcus aureus. The following FFA were used individually and in combination with each other: capric acid, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid. The concentrations were based on values, as they are given in the literature for Cheddar (ca. 100 ppm and multiples there of).

Several gram-negative test organisms (E.coli, P.vulgaris, Pseudomonas) proved to be insensitive, regardless of the experimental set-up and the FFA or combinations and concentrations there of. Marked, species dependent differences in sensitivity were seen by the gram-positive test organisms. B.cereus proved to be the most sensitive and C.tyrobutyricum the least. Sc.lactis, L.helveticus, and S.aureus behaved relatively similarly.

Myristic, palmitic, stearic, and oleic acids had even in higher concentrations little influence on the multiplication of microorganisms.

Capric, lauric, linoleic, and linolenic acids slowed down the growth of different test organisms to a different degree up till complete inhibition. Combinations of FFA were in this respect more effective than the single components. The inhibitory effect of lauric, linoleic, and linolenic acids,

could be attenuated by concentration dependent addition of oleic acid. As there are investigations present in the literature, in which FFA were added to the media before autoclave sterilization, the influence of the inhibitory effect of FFA was investigated in a few appropriate experiments. Even though oxidative changes were observed in different FFA, no difference could be determined to the results obtained with not autoclaved acids.

## 6. Literaturverzeichnis

AL-SHABIBI, M.M.A., E.H. LANGNER, J. THOBIAS und S.L. TUCKEY (1964):
Effect of added fatty acids on the flavor of milk.
J. Dairy Sci. 47, 295-296.

ANDERS, R.F. und G.R. JAGO (1964):
The effect of fatty-acids on the metabolism of lactic streptococci. I. Inhibition of bacterial growth and proteolysis.
J. Dairy Res. 31, 81-89.

ATRAMJENTOW, A.G., ATRAMJENTOWA, W.G., N.J. TSCHUMAKOW (1976):
Über freie Fettsäuren in Milch.
Molotschnaja Promischlennost (3), 26-27.

AULE, O. und H. WORSTORFF (1975):
Zum Einfluß einer mechanischen Behandlung der Milch auf die Menge freier Fettsäuren und des freien Fettes in Milch sowie auf die Separierbarkeit des Milchfettes.
Int. Dairy Fed. (Doc. 86).

BAGG, G.J., M.O. HABER und H.P. GREGOR (1966):
Composition of stearic and behenic acid monolayers from sodium containing substrates.
J. Colloid Interface Sci. 22, 138.

BEAN, H.S. (1967):
Types and characteristics of disinfectants.
J. appl.Bact. 30, 6.

BEHNKE, U. (1980):
Zur Biogenese des Käsearomas.
Die Nahrung 24 (1), 71-83.

BILLS, D.D., L.L. KHATRI und E.A. DAY (1963):
Method for the determination of the free fatty acids of milk fat.
J. Dairy Sci. 46, 1342-1347.

BORSHEIM, P. (1982):
Wie beeinflußt die Melkausrüstung die Milchqualität?
Meierposten 71 (5) 119.

BRANDL, E. (1970):
Mikrobielle Fettzersetzung in Milch und Milchprodukten.
Die Österreichische Milchwirtschaft 25, 53-55.

BROOME, M.C., M.P. THOMAS, A.J. HILLIER, J.F. HORWOOD und G.R. JAGO (1979):
The effect of linoleic acid on the growth and metabolism of Sc.lactis.
The Australian Journal Dairy Technol., 1979, 163-168.

BUCKER, E.R., J.H. MITCHELL und M.G. JOHNSON (1979):
Lactic fermentation of peanut milk.
J. of food Sc. (44), 1534-1538.

CAMPBELL, J.M., D.N. CROZIER, A.B. PAWAGI und I.A. BUIVIDS (1983):
In vitro response of S.aureus from cystic fibriosis patients to combination of linoleic and oleic acids addes to nutrient medium.
J. of Clinical Microbiology 18, 408-415.

COLES, R.S. und H.C. LICHSTEIN (1963):
The inhibition of malic enzyme of Lactobacillus arabinosus 17-5 by oleic acid. II. Prevention of enzyme inhibition.
Arch.Biochem. Biophys. 103, 191.

COSTILOW, R.N. und M.L. SPECK (1951):
Inhibition of Streptococcus lactis in milk by fatty acids.
J. Dairy Sci. 34, 1104-1110.

COWLES, R.B. (1941):
The germicidal action of the hydrogen ion and of the lower fatty acids.
Yale J. Biol. Med. 13, 571-578.

CRISTOW, P. (1971):
Über die Beziehungen zwischen Vitaminen und Mikroorganismen.
Zentralblatt für Bakteriologie Referate 223; 375.

DANIELLI, J.F. (1937):
The relations between surface pH, ion concentration and interfacial tension.
Proc. R. Soc.(B) 122, 155.

DEMAN, J.M. (1961):
Gas chromatography of the short-chain fatty acids of milk fats.
Milchwissenschaft, 16, 245.

DROESE und Mitarbeiter (1976):
Die Milch.
Zitiert nach GRAVERT, H.O. (1983).
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

DULLEY, J.R. und P.A. GRIEVE (1974):
Volatile fatty acid production in cheddar cheese.
Aust. J. Dairy Technol. 29, 120-123.

DURST, H.D., M. MILANO, E.J. KIKTA, Jr. S.A. CONNELY und E. ERUSHKA (1975):
Phenaeyl ester of fatty acids via crown ether catalysis for enhanced ultraviolet detection in liquid chromatography.
Anal. Chem. 47, 1797.

EFTHYMIOU, G. (1967):
Major free fatty acids of Feta cheese.
J. Dairy Sci. (1967), 20-24.

EISLER, D.M. und E.K. von METZ (1968):
Effects of fatty acids on pasteurella pesdis.
J. of Bakteriology 95, 1767-1773.

EITENMILLER, R.R., J.R. VAKIL und K.M. SHAHANI (1970):
Production and properties of P.roqueforti lipase.
J. Fd. Sci. 35, 130.

FAY, J.P. und R.N. FARIAS (1976):
Chilling cells enhances the bactericidal action of fatty acids on E.coli.
Applied and Environmental Microbiol. 31, 153-157.

FOISSY, H. (1969):
Über die Frage kurzkettiger Fettsäuren im Milchfett.
Die Österreichische Milchwirtschaft 24, 406-409.

FOSTER, J.W. und E.S. WYNEE (1948):
Physiological studies on spore germination with special reference to clostridium botulinum. IV. Inhibition of germination by unsaturated $C_{18}$ fatty acids.
J. Bacteriol. 55, 495-501.

FROBISHER, M. (1926):
Relation of surface tension to bacterial phenomena.
J. infect. Dis. 38, 66.

GADDIS, A.M. und Mitarb. (1959):
zitiert nach Lehrbuch der Lebensmittelchemie von J. Schormüller 1961.
Springer Verlag New York-Berlin.

GALBRAITH, H., T.B. MILLER, A.M. PATON und J.K. THOMPSON (1971):
Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magensium, ergocalciferol and cholestrol.
J. appl. Bact. 34, 803-813.

GALBRAITH, H. und T.B.MILLER (1973a):
Effect of metal cations and pH on the antibacterial activity and uptake of long chain fatty acids.
J. appl. Bact. 36, 635-646.

DIESELBEN (1973b):
Physicochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cells and their protoplasts.
J. appl. Bact. 36, 647-658.

GALBRAITH, H. und T.B. MILLER (1973c):
Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake.
J. appl. Bact. 36, 659-675.

GANDER, G.W., R.G. JENSEN und J. SAMPUGNA (1962):
Analysis of milk fatty acids by gas chromatography.
J. Dairy Sci. 45, 323-328.

GILBY, A.R. und A.V. FAW (1957):
Surface chemical studies on the protoplast membrane of micrococcus lysodeikticus.
Proc. 2nd. Int. Congr. Surface Activity 4, 262.

GILBY, A.R. und A.V. FAW (1960):
Lysis of protoplasts of micrococcus lysodeikticus by ionic detergents.
J.gen. Microbiol. 23, 19-26.

GOULDEN, J.D.S. (1970):
Flavours of dairy products.
Proc. Nutr. Soc. 29, 344-348.

GRAY, J.K. und N.J. WALKER (1972):
Annual Rep. N.2. Dairy Res. Inst. 41,
zitiert nach BEHNKE (1980), Zur Biogenese des Käsearomas.
Die Nahrung 24 (1), 71-83.

GRAVERT, H.O. (1983):
Die Milch.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

GYLLENBERG, H., H.N. ROSSANDER und P. POINE (1954):
On the growth inhibition of Lactobacillus bifidus by certain fatty acids.
Acta Chem. Scand. 8,133-134 (Dairy Sci. Abstr. 16, pp. 999, 1954)

HAMILTON, W.A. (1968):
The mechanism of the bacteriostatic action of tetrachlorsalicylanilide: a membrane-active antibacterial compound.
J. gen. Microbiol. 50, 441.

HAMILTON, W.A. (1970):
The mode of action of membrane-active antibacterials.
FEBS Symp.20, 71.

HANKINSON, C.L., W.J. HARPER und E. MIKOLAJCIK (1958):
A gas liquid chromatographic method for volatile fatty acids in milk.
J. Dairy Sci. 41, 1502-1509.

HÄNNI, H. und M. RYCHENER (1980):
Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch und Milchprodukten.
Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittelhygiene 71 (4), 509-525.

HANSPACH, I. (1981):
Untersuchungen über freie Fettsäuren als Aromasubstanzen verschiedener Käsesorten.
Diss. Gießen 1981.

HAROLD, F.M. und J.R. BAARDA (1968):
Inhibition of membrane transport in Sc.faecalis by uncouplers of oxidative phosphorylation and its relationship to protein conduction.
J. Bact. 96, 2025.

HASSINEN, J.B., G.T. DURBIN und F.W. BERNHART (1951):
The bacteriostatic effects of saturated fatty acids.
Arch. Biochem. and Biophys. 31 (2), 183-191.

HECZKO, P.B., LUTTICKEN, R., W. HRYNIEWICZ, M. NEUGEBAUER und G. PULVERER (1979):
Susceptibility of Staphylococcus aureus and group A, B, C, and G Streptococci to free fatty acids.
J.of Clinical Mikrobiology 9, 333-335.

HEILMEYER, L. (1949):
Chemotherapie der Tuberkulose.
Dtsch. med. Wschr. 74, 161-167.

HOFFMAN, C., T.R. SCHWEITZER und G. DALBY (1939):
Fungustatic properties of the fatty acids and possible biochemical significance.
Food Res., 4, 539-545.

HOOD, E.G., C.A. GIBSON und J.F. BOWEN (1950):
Lipolytic bacteria as cause of rancidity in Cheddar cheese.
Canad. Dairy and Ice Cream J. 28 (2), 27-30 (1949).
Zitiert nach: Milchwiss. 5 (1), 28 (1950).

HORWOOD, J.F. und G.T. LLOYD (1980):
A reliable gas-chromatographic method for the determination of the lower free fatty acids in cheese.
The Australian Journal of Dairy Technol. (1980), 30-32.

HOTCHKISS, R.D. (1946):
The nature of the bactericidal action of surface active agents.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 46, 479.

HUGO, W.B. (1967):
The mode of action of antibacterial agents.
J. appl. Bact. 30, 17.

HUGO, W.B. und S.F. BLOOMFIELD (1971):
Studies of the mode of action of the phenolic antibacteria agent Fentichlor against S.aureus and E.coli. I. The adsorption of Fentichlor by the bacterial cell and its antibacterial activity.
J. appl. Bact. 34, 557.

JELLEMA, A. (1975):
Note on the susceptibility of bovine milk to lipolysis.
Neth. Milk Dairy J. 29, 145.

JELLEMA, A., C.J. SCHIPPER (1975):
Einfluß der Melkmaschineninstallation auf lipolytische Veränderungen in Rohmilch.
Int. Dairy Fed. (Doc. 86), 138.

JORDI, H.C. (1978):
Seperation of long and short chain fatty acids as Naphthacyl and substituted phenacyl esters by high premire liquid chromatography.
J. Lig. Chromatogr. 1, 215.

KABARA, J.J., O.M. SWIECZKOWSKI, D.M. CONLEY und J.P. TRUANT (1972):
Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents.
Antimicrob. Agents Chemother. (2), 23-28.

KAUFMANN, H.P. (1969):
Handbuch der Lebensmittel-Chemie von J. SCHORMÜLLER, Band IV.

KHAN MAHMOOD und M. KATAMAY (1968):
Antagonistic effect of fatty acids against Salmonella in meat and bone meal.
Appl. Microbiology, 402-404.

KHATRI, L.L. und E.A. DAY (1962):
Analysis of the free fatty acids of fresh milk fats and ripened cream butter.
J. Dairy Sci. 660.

KIESEL, A. (1913):
Recherches sur l'action de divers acides et sels acides sur le developpement de l'aspergillus niger.
Ann. Inst. Pasteur 27, 391-420 und 481-487.

KINTNER, J.A. und E.A. DAY (1965):
Major free fatty acids in milk.
J. Dairy Sci. (1965), 1575-1581.

KISZA, J. und K. BATURA (1969):
Zusammensetzung und Eigenschaften des Fettes normaler und anormaler Milch (Mastitis).
Milchwissenschaft 24, 465-468.

KODICEK, E. und A.N. WORDEN (1944):
Effect of unsaturated fatty acids upon the growth of Lactobacillus helveticus and other gram-positive bacteria.
Nature 154, 17-18.

DIESELBEN (1945).
The effect of unsaturated fatty acids on Lactobacillus helveticus and other gram-positive microorganisms.
Biochem. J. 39, 78-85.

KOHN, A., J. GITELMAN und M. INBAR (1980):
Interaction of polyunsaturated fatty acids with animal cells and enveloped viruses.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 18, 962-968.

KULSHRESTHA, D.C. und E.H. MARTH (1970):
Inhibition of lactic Streptococci and some pathogenic bacteria by certain milk-associated volatile compounds as measured by the disc assay.
J. Milk Food Technol. 33, 305-310.

DIESELBEN (1974a):
Inhibition of bacteria by some volatile compounds associated with milk. I. E.coli.
J. Milk Food Technol. 37, 510-516.

DIESELBEN (1974b):
Inhibition of bacteria by some volatile compounds associated with milk. III. Staphylococcus aureus.
J. Milk Food Technol. 37, 545-550.

DIESELBEN (1974c):
Inhibition of bacteria by some volatile compounds associated with milk. IV. Sc. lactis.
J. Milk Food Technol. 37, 593-599.

DIESELBEN (1974d):
Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. VI. Streptococcus thermophilus.
J. Milk Food Technol. 37, 606-611.

DIESELBEN (1975a):
Inhibition of Streptococcus lactis and Salmonella typhimurium by mixtures of some volatile and non-volatile compounds associated with milk.
J. Milk Food Technol. 38, 138-141.

DIESELBEN (1975b):
Some volatile and non-volatile compounds associated with milk and their effects on certain bacteria.
J. Milk Food Techn. 38, 604-620.

KUZDZAL-SAVOIE, S. und W. KUZDZAL (1962):
Schwankungen in den relativen Verhältnissen der Milchfette der Kuh bei Weidehaltung.
XVI. Intern. Milchwirtsch. Kongr. Bd. A 270-280.

LIEBICH, H.M., D.R. DOUGLAS, E. BAYER und A.ZLATKIS (1970):
The volatile flavor components of Cheddar cheese.
J. Chrom. Sci. 8, 355-359.

MACASKIE, L.E. (1982):
Inhibition of growth of Brochothrix thermosphacta by palmitic acid.
J. appl. Bac. 52, 339-343.

MAXCY, R.B. (1964):
Influence of surface active agents on same lactic Streptococci.
J. Dairy Sci., 47, 1283.

MAXCY, R.B. und R.C. CHANDAN (1962):
Inhibition effects of fatty acids and other surface-active compounds on Streptococcus lactis.
J. Dairy Sci. 45, 654.

MANNING, D.J. und H.M. ROBINSON (1973):
The analysis of volatile substances associated with Cheddar-cheese aroma.
J. Dairy Res. 40, 63-75.

MITCHELL, P. (1966):
Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.
Biol. Rev. 41, 445.

MOSSEL, D.A.A., F.V. ROSSEM, M. KOOPMANS, M. HENDRIKS, M. VEROUDEN und I. EELDERINK (1980):
Quality control of solid culture media: A comparison of the classic and the so-called ecometric technique.
J. appl. Bact. 49, 439-454.

NAWAR, W. (1969):
Thermal degradation of lipids.
J. Agr. Food Chem. 17, 18-21.

NETTER, H. (1969):
Theoretical Biochemistry. Zitiert nach H. GALBRAITH und T. B. MILLER (1973a), Effect of Metal Cations and pH on the Antibacterial Activity and Uptake of Long Chain Fatty Acids.
J. appl. Bact. 36, 635-646.

NIEMAN, C. (1954):
Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms.
Bacteriol. Rev. 18, 147-163.

NIEUWENHOF, F.F.J. und G. HUP (1970):
Gas-chromatographic determination of free fatty acids in cheese.
Neth. Milk Dairy J. 25, 175-182.

NILSSON, R. und S. WILLART (1966):
Influence of fatty acids on activity of starter culture.
Dairy Sci. Abstr. 28, 2497.

OBRETENOW, T., D. DIMITROFF und M. OBRETENOWA (1978):
Anwendung mikrobieller Enzympräparate in der Käseproduktion.
5. Untersuchung der flüchtigen Fettsäuren von mit Mesenterin hergestelltem Salzlakenkäse.
Milchwissenschaft 33 (9), 545-547.

OHREN, J.A. und S.L. TUCKEY (1965):
Relation of flavor development in Cheddar cheese to chemical changes in the fat of the cheese.
J. Dairy Sci. 52, 598-607.

PARDUN, H. (1969):
Handbuch der Lebensmittelchemie, Band IV. Fette und Lipoide.
Springer-Verlag, New York-Berlin.

PATTON, S., R.D. McCARTHY, L. EVANS und T.R. LYNN (1960):
Structure and synthesis of milk fat. I. Gas chromatographic analysis.
J. Dairy Sci. 43, 1187-1195.

PODESTA, A. und G. BERTOLDINI (1967):
I. Inhibitory action of fatty acids on Str.lactis, Str.agalactiae, L.bulgaricus, Staph. aureus, E.coli and B.cereus.
Boll Ist. sieroter. Milan. 46 (11/12) 348-55.
(Dairy Sci. Abstr.(30), 3151, 1968

POJARKOWA, G.S., N.W. MAKARYNA, F.A. WYSCHMIRSKI (1979):
Über Veränderungen des Gehalts an freien flüchtigen Fettsäuren in Süßrahmbutter während der Lagerung.
Referatiwnij Schurnal. Chimija 19 p. Nr. 1R 242.

POWNEY, J. und G.C. ADDISSON (1938):
The properties of detergent solutions.
Trans. Faraday Soc. 34, 356.

POZANSKI, S., A. SURAZYNKI und T. d'OBYRN (1968):
Fermentation and proteolysis of certain strains of lactic acid bacteria in the presence of fatty acids.
Lait (48), 261-274 (Dair. Sci. Abstr. (30), 354, 1968).

RANDOLPH, H.E., N.E. ERWIN (1974):
Zum Einfluß von Mastitiden auf Eigenschaften der Milch.
X. Fettsäurenzusammensetzung.
J. Dairy Sci. 57 (8), 865-868.

RAPPAPORT, H. und J.M. GOEPFERT (1978):
Thermal injury and recovery of Bacillus cereus.
J. Food Prot. 41, 533-537.

REITER, B. und M.E. SHARPE (1971):
J. Appl. Bact. 34, 63, zitiert nach BEHNKE, U. (1980),
Zur Biogenese des Käsearomas.
Die Nahrung 24 (1), 71-83.

RENNER, E. (1982):
Gehalt an freien Fettsäuren in der Rohmilch in Abhängigkeit von verschiedenen Produktionsfaktoren und in der UHT-Milch.
Deutsche Milchwirtschaft (7), 233-238.

RIGLER, N.E. und G.A. CREATHOUSSE (1960):
The chemistry of resistance of plants to phymatotrichum root rot. VI. Fungicidal properties of fatty acids.
Amer. J. Bot. 27, 701.

SALIH, A.M.A., M. ANDERSON (1978):
Freie Fettsäuren und hoher Zellgehalt in Milch. Kurzmitteilungen XX. Internationaler Milchwirtschafts-Kongreß D 34-35.

SALTON, M.R.J. (1951):
The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects.
J. gen. Microbiol. 5, 391.

SALTON, M.R.J. (1968):
Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability.
J. gen. Physiol. 52, 227.

SCHOLEFIELD, P.G. (1963):
Fatty acids and their analogues.
In: R.M. HOCHSTER und J.H. QUASTEL (Eds.), Metabolic Inhibitors, zitiert nach H. GALBRAITH und T.B. MILLER (1973c).

SCHWAB, H. (1969):
Effect of rancid milk on growth and activity of thermophilic lactic acid bacteria.
Schweiz. landw. Forsch. 8, (3/4), 249-70.

SENFT, B. und F. KLOBASA (1970):
Untersuchungen über das Fettsäurespektrum in der Kolostralmilch von Kühen.
Milchwissenschaft 25, 391-394.

SHAHIN, Y. (1977):
Der Gehalt an FFS in der Rohmilch in Abhängigkeit von Produktionsverfahren.
Dissertation Universität Gießen.

SHAHIN, Y. (1982):
Einfluß der Lagerungstemperatur auf den Gehalt von freien Fettsäuren in Butter.
Deutsche Milchwirtschaft 2, 85-88.

SHEU, C.W. und E. FREESE (1972):
Effects of acetate and other short-chain fatty acids on sugar and amino acid uptake of Bacillus subtilis.
J. Bact. 111, 525-530.

SHEU, C.W. und E. FREESE (1973):
Lipolysaccharide layer protection of gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids.
J. Bact. 115, 869-875.

SMITH, L.M. (1961):
Quantitative fatty acid analysis of milk fat by gas liquid chromatography.
J. Dairy Sci. 44, 607-622.

SMITH, J.L. und J.A. ALFORD (1966):
Inhibition of microbiol lipase by fatty acids.
Appl. Microbiol. (14), 699.

SPECTOR, H. (1946):
The comparative effect of the fatty acids of butter fat and corn oil on the growth and metabolism of microorganisms.
Arch. Biochem. 11, 167-177.

SPECTOR, A.A. und D.E. BRENNEMANN (1972):
Effect of FFA structure on binding to rat liver mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta, 260, 433-438.

SPINK, J.A. (1963):
Ionization of monolayers of fatty acids from $C_{14}$ to $C_{18}$.
J. Colloid. Sci. 18, 512.

STOCK, C.C. und T. FRANCIS (1943):
Additional studies of the inactivation of the virus of epidermis influenza by soaps.
J. Immunol. 47, 303.

SUHREN, G., J. HAMANN, W. HEESCHEN und A. TOLLE (1981):
Zum Einfluß tierindividueller Faktoren der Gemelksfraktion und des Melkzeitintervalls auf den Gehalt freier Fettsäuren in Rohmilch.
Milchwissenschaft 36 (3), 150-153.

SUHREN, G. (1981):
Freie Fettsäuren - Ursache und Bedeutung für die Qualität von Milchprodukten.
Die Molkerei-Zeitung Welt der Milch 35, 933-937.

TALLAMY, P.T. und H.E. RANDOLPH (1969):
Influence of Mastitis on properties of milk.
IV. Hydrolytic Rancidity.
J. Dairy Sci. 52, 1569-1572.

TARASSUK, N.P. und M. JAGUCHI (1958):
Effect of Mastitis on susceptibility of milk to lipolysis.
J. Dairy Sci. 41, 1482.

TÄUFEL, K. (1958):
Zitiert nach Handbuch der Lebensmittelchemie von J. SCHORMÜLLER (1961).
Springer Verlag, New York-Berlin.

THAKUR, M.K., J.R. KIRK und T.J. HEDRICK (1975):
Changes during ripening of unsalted Cheddar cheese.
J. Dairy Sci. 58, 175-180.

TIMMEN, H. (1977):
Die Fettsäurenzusammensetzung des Butterfettes deutscher Milcherzeugungsgebiete.
Die Molkerei-Zeitung Welt der Milch 31 (51/52), 1701-1706.

TOLLE, A. und W. HEESCHEN (1975):
Freie Fettsäuren in der Milch unter Berücksichtigung der Fließbedingungen in Melkeinrichtungen.
Int. Dairy Fed. (Doc. 86), 134.

TOMARELLI, R.M., R.F. NORRIS, C.S. ROSE und P. GYÖRGY (1950):
The effect of fatty acids on the growth of strains of Lactobacillus bifidus.
J. Biol. Chem. 187 (5), 197-204.

TWEETEN, T.N. und D.L. WETZEL (1979):
High performance liquid chromatographic analysis of fatty acid derivatives from grain and feed extracts.
Cereal Chem. 56, 398.

VADEHRA, D.V. und L.G. HARMON (1965):
Action of lipases of S.aureus on milk fat.
Appl. Microbiol. 13, 335-339.

WHEELER, D.H. (1969):
Handbuch der Lebensmittel-Chemie von J. SCHORMÜLLER, Band IV. (1969).

WILLART, S. (1959):
Zitiert nach SJÖSTROM, G.: Lipase problems in milk and dairy products. A review.
Milk and Dairy Res. Sta. Alnarp, Rep. Nr. 58 (1959).

WITHYCOMBE, D.A. und R.C. LINDSAY (1969):
Beweis für die Verminderung freier Fettsäuren in erhitzter Milch.
J. Dairy Sci. 52, 1100.

WOODROFFE, R.C.S. und B.E. WILKINSON (1966):
Location of tetrachlorosalicylanilide taken up by Bacillus megaterium.
J. gen. Microbiol. 44, 353.

WORSTORFF, H., W. HEESCHEN, J.R. REICHMUTH und A. TOLLE (1972):
Freie Fettsäuren in der Milch in Abhängigkeit von strömungstechnischen Bedingungen der Melkanlagen.
Milchwissenschaft 27 (5), 477-480.

WORSTORFF, H. (1975):
Mechanische Faktoren in der Melkanlage und ihr Einfluß auf die Werte freier Fettsäuren in der Milch.
Int. Dairy Fed. (Doc. 86).

ZEGARSKA, Z. und J. BUDSLAWSKI (1973):
Freie Fettsäuren in Käsen während der Reifung. II. Höhere Fettsäuren.
Zesz. Nauk. ART Olszt. (1), 183-196 (zit. in Milchwiss. 1973, 1565).

Herrn Professor Dr. G. Terplan möchte ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Den wissenschaftlichen Assistenten des Instituts, Herrn Dr. K.-H. Jaschke und Herrn Dr. H. Becker, danke ich für die vielen Anregungen und die allzeit liebenswürdige Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Für die stete Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Frau Schäffer und Frau Kollerbauer, bedanken.

# Lebenslauf

| | |
|---|---|
| Name: | Özer Ergün |
| Geburtsdatum: | 5.12.1955 |
| Geburtsort: | Balaban / Edirne |
| Staatsangehörigkeit: | türkisch |
| Eltern: | Gökalp Ergün, Lehrer, und<br>Zarife Ergün, geb. Altay |
| Familienstand: | seit 14.9.1980 verheiratet mit Nurhan Ergün, geb. Ürlü |
| Schulbildung und Studium: | 1961-1966 Volksschule in Uzunköprü<br>1966-1972 Gymnasium in Uzunköprü<br>1972-1977 Studium der Tiermedizin an der Universität Istanbul |
| Approbation: | Istanbul, Juni 1977 |
| Berufliche Tätigkeit: | 1.2.1978 - 1.6.1978 staatlicher Tierarzt in Amasya<br>1.6.1978- 1.10.1978 wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät Istanbul. |

Seither bin ich als Stipendiat des türkischen Erziehungsministeriums in Deutschland. Seit dem SS 1980 bin ich an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München als Doktorand am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch immatrikuliert.